



**UNIVERSITE DE TUNIS
EL MANAR**



**UNIVERSITE LILLE1
SCIENCES ET TECHNOLOGIES**

THESE en CO-TUTELLE

présentée par

Riad Hammami

pour l'obtention du grade de

Docteur des Universités de Tunis El Manar et de Lille I

(Spécialité : Biologie)

**«APPROCHES BIOCHIMIQUES ET BIOINFORMATIQUES POUR
L'ÉTUDE DE LA RELATION STRUCTURE/FONCTION DES
PEPTIDES ANTIMICROBIENS D'ORIGINE VÉGÉTALE»**

Soutenue le 13 avril 2009 devant la commission d'examen :

Prof. Amel EL GAIED	Président
Prof. Neculai Doru MIRON	Rapporteur
Prof. Neila TRIFI-FARAH	Rapporteur
Prof. Jeannette BEN HAMIDA	Co-directeur de thèse
Prof. Gérard VERGOTEN	Co-directeur de thèse
Dr. Jean-Marie LACROIX	Examinateur
Prof. Ismail FLISS	invité

Remerciements

Comme le veut la tradition, je vais tenter de satisfaire au difficile exercice de la page des remerciements, peut-être la tâche la plus ardue de ces années de thèse.

La première personne que je tiens à remercier est Madame le Professeur Jeannette BEN HAMIDA, ma co-directrice de thèse, qui a su me laisser la liberté nécessaire à l'accomplissement de mes travaux, tout en y gardant un œil critique et avisé. Merci pour votre aide, votre rigueur scientifique et vos conseils toujours judicieux.

J'aimerais remercier tout particulièrement le Professeur Ismaïl Fliss pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire de biochimie et de microbiologie (Centre de Recherche STELA, Université Laval), et permis ainsi d'effectuer ce travail dans les meilleures conditions. Je le remercie de tous les conseils et les encouragements qu'il a su m'apporter.

Je témoigne toute ma gratitude au Professeur Gérard Vergoten pour m'avoir co-encadré tout au long de ces années que nous avons passées ensemble. Ses compétences scientifiques, ses conseils et sa qualité humaine ont permis de réaliser ce travail dans un climat très favorable.

Je remercie respectueusement Madame Amel EL GAIED, Professeur d'Immunologie à la Faculté des Sciences de Tunis, qui m'a fait l'honneur de présider le jury de cette Thèse malgré ses nombreuses charges. Je tiens à lui exprimer ma gratitude et mon grand respect.

Je tiens à remercier Madame Neila TRIFI-FARAH, Professeur de Génétique à la Faculté des Sciences de Tunis, et Monsieur Neculai Doru MIRON, Professeur au département de chimie et génie alimentaire à l'Université de Bacau, Roumanie, qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail et pour le temps qu'ils ont consacré pour la lecture de ce document et d'en être les rapporteurs malgré leurs nombreux engagements.

Je tiens à remercier également Monsieur Jean-Marie LACROIX, Maître de Conférences de Microbiologie à la l'Université de Lille I, d'avoir accepté d'examiner mes travaux et pour ses précieux et constructifs conseils.

Je remercie également :

- *A Lille, tous les membres du labo « UMR CNRS 8576 » et tout particulièrement Dr Philippe Lagant, Dr Marie-Christine Slomianny, l'équipe du Dr Jean-Marie Lacroix pour leur accueil chaleureux et leur collaboration,*
- *A Québec, toute l'équipe du Prof. Fliss Ismaïl pour leur accueil chaleureux et tout particulièrement Dr Ehab Kheadr, Diane Gagnon et Alain Gaudreau pour leur collaboration et support,*
- *A Tunis, tous les membres du labo et tout le personnel de l'ISSBAT pour leur collaboration et gentillesse,*
- *A Medenine, le Prof. Mohamed Neffati et toute son équipe pour leur collaboration et leur accueil chaleureux,*

J'exprime aussi ma reconnaissance à Yassine, Kamel, AbdelKader, Abdelmagid, Achref, Amina, Anouer, Christophe, Dinouch, Ezzeddine, Fabien, Fadhel, Karim, Khaled, Marie-Christine, Moez, Nadia, Riadh, Soufien, Wassef et tous mes compagnons de route pour m'avoir manifesté leur amitié et pour les moments forts passés ensemble.

Finalement, je remercie ceux dont le nom n'apparaît pas dans cette page et qui m'ont aidé d'une manière ou d'une autre. Ils se reconnaîtront... Sans oublier tous ceux qui liront cette thèse et la feront vivre.

Dédicace

Je tiens à remercier du fond du cœur toute ma famille pour leur soutien et tout l'amour qu'elle me témoigne chaque jour. Je leur dédie ce mémoire.

A la mémoire de mes grands-parents

A mes parents Fatma et Mohamed-Salah

A mes sœurs Sarra et Asma

A mes frères Dhafer et Mohamed-Ali

A tous ceux dont l'affection et l'amitié me sont chères

Merci à Tous.

Résumé

Des approches différentes mais complémentaires de bioinformatique et de biochimie ont été utilisées lors de cette étude dans le but d'identifier, d'étudier et de caractériser de nouveaux peptides antimicrobiens d'origine végétale.

Dans un premier temps, et compte tenu de la grande diversité des peptides antimicrobiens mis au jour jusqu'à présent, nous nous sommes fixés comme premier objectif de développer une plateforme informatique complète comprenant un logiciel, Scientific DataBase Maker (SciDBMaker) et une base de données baptisée PhytAMP. Cette plateforme permet l'extraction, l'analyse et le triage de données sur les protéines à partir de la base de données Swiss-Prot. Elle permet également de rassembler des informations taxonomiques, microbiologiques et physico-chimiques importantes sur les peptides antimicrobiens des plantes. Ainsi la constitution de cette plateforme ouvre de nouvelles perspectives informatives, en particulier celles relatives à la prédiction des relations structure / fonction en relation avec les organismes cibles et donc leur mode d'action.

Dans un deuxième temps, une approche expérimentale a été utilisée afin d'évaluer le potentiel antimicrobien de quelques plantes spontanées issues des régions arides de la Tunisie. Ainsi, l'activité antimicrobienne d'*Oudneya africana* R. Br. (Brassicaceae), de *Juniperus phoenicea* L. (Cupressaceae) et de *Pistacia atlantica* Desf. (Anacardiaceae), trois espèces de plantes spontanées utilisées à des fins médicinales dans les zones arides de la Tunisie, de même que leurs propriétés physico-chimiques ont été évaluées. Les résultats obtenus ont montré la présence d'une activité antimicrobienne dans les trois plantes étudiées. Cette étude comparative a établi clairement le potentiel des plantes médicinales spontanées des régions arides de la Tunisie comme source d'agents antimicrobiens. Une étude poussée réalisée sur un extrait actif de l'une des trois plantes, *Oudneya africana*, a montré la présence de molécule peptidique de faible masse moléculaire ayant un très large spectre d'action antimicrobien. L'étude de cet extrait a été effectuée et a permis de mettre en évidence le potentiel d'exploitation aussi bien dans le secteur agroalimentaire que pharmaceutique de ces molécules bioactifs naturelles.

Notre travail constitue une contribution importante à l'étude des peptides antimicrobiens d'origine végétale. Des informations scientifiques très originales ont été générées tout au long de notre étude. Les connaissances fondamentales et appliquées générées ouvrent des perspectives multiples pour une exploration plus poussée de ce champ d'activité encore très peu exploité.

Abstract

Different approaches but complementary in bioinformatics and biochemistry have been used during this study to identify, investigate and characterize new plant antimicrobial peptides.

At first, and given the wide diversity of antimicrobial peptides uncovered so far, we have set the first goal to develop a platform that includes software, Scientific DataBase Maker (SciDBMaker) and a database PhytAMP. This platform allows the extraction, analysis and sorting of data on proteins from the Swiss-Prot database. It can also gather taxonomic, microbiological and physicochemical information on plant antimicrobial peptides. Thus the development of this platform opens up new informative prospects, particularly those relating to the prediction of structure / function in relation to the target organisms and thus their mode of action.

In a second time, an experimental approach was used to evaluate the antimicrobial potential of some spontaneous plants from arid regions of Tunisia. Thus, the antimicrobial activity of *Oudneya africana* R. Br (Brassicaceae), *Juniperus phoenicea* L. (Cupressaceae) and *Pistacia atlantica* Desf. (Anacardiaceae), three spontaneous plant species used for medicinal purposes in the arid areas of Tunisia, as well as their physicochemical properties have been evaluated. The results showed the presence of antimicrobial activity in the three studied plants. This study has clearly established the potential of medicinal plants growing wild in arid regions of Tunisia as a source of antimicrobial agents. A study conducted on an active extract of one of three plants, *Oudneya africana*, showed the presence of peptide molecule of low molecular weight with a very broad spectrum antimicrobial action. The study of the extract was performed and revealed the potential of such bioactive natural molecules for exploitation in both the food and pharmaceutical industries.

Our work is an important contribution to the study of plant antimicrobial peptides. Very original scientific informations have been generated throughout our study. The generated fundamental and applied knowledge open multiple perspectives for further exploration of this field of activity which still untapped.

خلاصة

نُهج مختلفة ولكنها متكاملة في المعلوماتية الحيوية والكيمياء الحيوية استخدمت خلال هذه الدراسة لتحديد ووصف بيئات جديدة مستخرجة من النبات مضادة للميكروبات.

في البداية ، ونظرًا إلى التنوع الواسع للبيئات المضادة للميكروبات التي كشفت حتى الآن ، وضعنا الهدف الأول وهو تطوير منصة تتضمن البرمجيات ، صانع قواعد البيانات العلمية (SciDBMaker) وقاعدة البيانات PhytAMP. وهذا يتيح منصة استخراج وتحليل وفرز البيانات من على البروتينات من قاعدة البيانات Swiss-Prot. ويمكن أيضًا من جمع معلومات تصنيفية، ميكروبولوجية وفيزيوكيميائية هامة عن البيئات المضادة للميكروبات المستخرجة من النبات. وهكذا فإن تشكيل هذه المنصة يفتح آفاقاً جديدة بالمعلومات ، ولا سيما تلك المتعلقة بالتأثير هيكل / الوظيفة بالنسبة إلى الكائنات الحية المستهدفة وبالتالي طرقها في العمل.

في المرة الثانية، كانت تجربة النهج المستخدمة لتقدير مضادات الميكروبات المحتملة من بعض النباتات التلائمية من المناطق القاحلة من تونس. وهكذا، فإنه تم تقييم نشاط مضادات الميكروبات مستخرجة من *Oudneya africana* R. Br (*Cupressaceae*) ، *atlantica* Desf. (*Brassicaceae*) ، *Juniperus phoenicea* L. (*Anacardiaceae*) ، *Pistacia* فضلاً عن خواصها الكيميائية الفيزيائية. وأظهرت النتائج وجود نشاط لمضادات الميكروبات في النباتات الثلاث. هذه الدراسة تبيّن بوضوح أهمية النباتات الطبية البرية الموجودة في المناطق القاحلة من تونس بوصفها مصدراً لمضادات الجراثيم. دراسة أجريت على نشط واحد مشتق من *Oudneya africana* ، أظهرت وجود بيبيد منخفض الوزن مع طيف واسع كما مضاد للميكروبات. الدراسة المنجزة كشفت عن إمكانات استغلال هذا التأثير الأحيائي الطبيعي للجزيئات في كل من الصناعات الغذائية والصيدلية.

عملنا هو مساهمة هامة لدراسة البيئات المضادة للميكروبات النباتية المنشآ. معلومات علمية هامة كشفت من خلال دراستنا. هذه المعارف الأساسية والتطبيقية تفتح منظورات متعددة لمزيد من استكشاف هذا الميدان من النشاط والتي لا تزال غير مستغلة.

Table des matières

Liste des tableaux	xii
Liste des figures	xiii
INTRODUCTION GENERALE	1
1. Acquisition de résistance contre les antibiotiques et les fongicides.....	2
2. Intérêts d'étude des peptides antimicrobiens	3
2.1. Applications agronomiques	3
2.2. Applications thérapeutiques.....	4
3. Les peptides antimicrobiens chez les êtres vivants.....	6
3.1. Les peptides antimicrobiens chez les procaryotes	6
3.2. Les peptides antimicrobiens chez les plantes.....	6
3.3. Les peptides antimicrobiens chez les invertébrés	7
3.4. Les peptides antimicrobiens chez les vertébrés	8
4. Structure des peptides antimicrobiens.....	8
4.1. Les peptides antimicrobiens à structure en hélice α	9
4.2. Les peptides antimicrobiens à structure en feuillet β	9
4.3. Les peptides antimicrobiens riches en cystines	10
4.4. Les peptides antimicrobiens à forte répétition de certains acides aminés	10
4.5. Les peptides antimicrobiens contenant des acides aminés modifiés	10
5. Mécanismes d'action des peptides antimicrobiens	11
5.1. Activité antibactérienne	11
5.1.1. Modèle 'douve de tonneaux' ou 'barrel stave'	11
5.1.2. Modèle 'pores toroïdaux' ou 'toroidal-pore'	12
5.1.3. Modèle 'tapis' ou 'Carpet'	13
5.1.4. Mécanismes d'action sans perturbation de la membrane cellulaire	14
5.3. Activité antifongique	15
5.2 Activité antivirale.....	16
6. Classification des peptides antimicrobiens d'origine végétale	17
6.1. Les thionines	17
6.2. Les défensines	18
6.3. Les snakines	19
6.4. Les héveines	19
6.5. Les knottines	20

6.6. Les cyclotides.....	20
6.7. Les LTPs	21
6.8. Les autres membres.....	22
<i>7. Hypothèse et objectifs.....</i>	23
MATERIEL & METHODES.....	25
<i>1. Matériel biologiques.....</i>	26
1.1. Choix et collection de la matière végétale	26
1.2. Microorganismes et conditions de culture	26
<i>2. Méthodes expérimentales</i>	26
2.1. Préparation des extraits végétales	26
2.1.1. Préparation des extraits bruts.....	26
2.1.2. Extraction acétonique des peptides actifs.....	27
2.1.3. Extraction méthanolique des peptides actifs	27
2.2. Dosage des protéines.....	27
2.3. Tests d'activité antimicrobienne	28
2.3.1. Méthode de diffusion sur agar.....	28
2.3.2. Concentration minimale inhibitrice (CMI).....	28
2.3.3. Suivi de la croissance microbienne en fonction du temps	28
2.3.4. Mode d'action de l'extrait actif sur les bactéries sensibles	28
2.3.5. Effet des cations divalents sur l'extrait d' <i>Oudneya africana</i>	29
2.3.6. Evaluation de l'effet synergique des antibiotiques avec l'extrait de plante <i>O. africana</i> .	29
2.3.7. Détermination de l'effet post-antibiotique	29
2.4. Microscopie électronique à balayage (MEB)	30
2.5. Traitements thermiques, protéases et stabilité dans les solvants organiques.....	30
2.6. Analyses statistiques	31
RESULTATS & DISCUSSIONS	32
<i>Chapitre 1: Création d'un outil de conception des bases de données protéiques : SciDBMaker.....</i>	33
<i>1. Présentation.....</i>	34
<i>2. Résumé.....</i>	35
<i>3. Introduction</i>	35
<i>4. Matériel & méthodes</i>	36

5. Résultats & discussion.....	36
6. Conclusions	37
7. Disponibilité & exigences.....	38
8. Contributions.....	38
9. Remerciements.....	40
Chapitre 2 : PhytAMP: une base de données dédiée aux peptides antimicrobiens de plantes.....	41
1. Présentation.....	42
2. Résumé.....	43
3. Introduction	43
4. Construction & contenu.....	44
4.1. Construction & méthodes	44
4.2. Description de l'interface Web	44
5. Utilité & Discussion	44
5.1. Construction de l'arbre phylogénétique.....	44
5.2. La base de données PhytAMP	45
6. Conclusion	47
7. Remerciements.....	47
Chapitre 3: Potentiel antimicrobien d'extraits aqueux de trois plantes spontanées des régions arides de la Tunisie	49
1. Présentation.....	50
3. Introduction	51
4. Matériel & Méthodes.....	52
4.1. Sélection et collecte des plantes.....	52
4.2. Préparation des extraits de plantes	52
4.3. Caractérisation des composés actifs.....	52
4.4. Tests d'activité antimicrobienne	52
4.4.1. Souches microbiennes et milieu de culture	52
4.4.2. Méthode de diffusion sur agar.....	52
4.4.3. Méthode de dilution critique et détermination de la CMI	52
4.4.4. Inhibition de la croissance microbienne en fonction du temps.....	53
4.5. Analyses statistiques	53

<i>5. Résultats & discussion.....</i>	53
<i>5.1. Activité antimicrobienne.....</i>	53
<i>5.2. Caractérisation des composés antimicrobiens</i>	53
<i>6. Remerciements.....</i>	55
 <i>Chapitre 4: Activité antimicrobienne et mode d'action d'un extrait peptidique d'<i>Oudneya africana</i></i>	57
<i>1. Présentation.....</i>	58
<i>2. Résumé.....</i>	61
<i>3. Introduction</i>	62
<i>4. Matériel & Méthodes.....</i>	64
<i>5. Résultats.....</i>	70
<i>6. Discussions</i>	75
<i>7. Remerciements.....</i>	75
 CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES.....	87
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	92
ANNEXES.....	108

Liste des tableaux

Introduction

Tableau 1: Quelques applications de plantes transgéniques exprimant des peptides antimicrobiens	4
--	---

Chapitre 2

Table 1: Occurrence des acides aminés dans la base de données PhytAMP	46
--	----

Chapitre 3

Table 1: activité antimicrobienne de plusieurs extraits de <i>Juniperus phoenicea</i> , <i>Pistacia atlantica</i> et <i>Oudneya africana</i> évaluée par test de diffusion sur agar	54
--	----

Table 2 Détermination de la CMI des extraits de plant contre des pathogènes d'origine alimentaire	55
--	----

Chapitre 4

Table 1: Détermination des CMI de l'extrait d' <i>Oudneya africana</i> contre plusieurs microorganismes	85
--	----

Table 2: Synergisme entre l'extrait AS-3000 et les antibiotiques contre les souches <i>Listeria ivanovii</i> and <i>E. coli</i>	86
--	----

Liste des figures

Introduction

Figure 1: Le modèle ‘douve de tonneaux’ (barrel stave)	12
Figure 2: Le modèle ‘pores toroïdaux’ (toroidal-pore)	13
Figure 3: Le modèle tapis (carpet)	14
Figure 4: Différents mécanismes d’action antimicrobiens sans interaction avec la membrane bactérienne	15
Figure 5: Modèle du mode d’action des peptides antifongiques	16

Chapitre 1

Figure 1: Diagramme de fonctionnement.....	37
Figure 2: Interface utilisateur	38
Figure 3: Résultat type d’un BLAST	39
Figure 4: Fenêtre préférences d’affichage.....	39

Chapitre 2

Figure 1: Interface utilisateur de la base de données PhytAMP.....	45
Figure 2: Arbre phylogénique des peptides antimicrobiens existant dans la base de données PhytAMP.....	46
Figure 3: Histogramme de la distribution de la longueur des peptides dans la base de données PhytAMP.....	46
Figure 4: Diagramme de répartition des acides aminés acides et basiques entre les peptides de la base de données PhytAMP	47
Figure 5: Répartition des activités reportées des peptides compilées dans le PhytAMP base de données.....	47

Chapitre 3

Figure 1: Croissance de <i>Listeria monocytogenes</i> et <i>Escherichia coli</i> en présence d’extraits de plantes.....	55
--	----

Chapitre 4

Figure 1: Mode d'action de l'extrait d' <i>Oudneya africana</i> sur <i>Listeria ivanovii</i> HPB28 (a) et <i>Escherichia coli</i> (b)	79
Figure 2: Determination de la taille de AS-3000 par PAGE-SDS tricine et detection de l'activité antimicrobienne sur gel acrylamide.....	80
Figure 3: Effet de MgSO ₄ , CaCl ₂ et MnSO ₄ combinés à AS-3000 sur <i>Listeria ivanovii</i> (noir) et <i>Escherichia coli</i> (gris).	81
Figure 4: Lyse cellulaire de <i>Listeria ivanovii</i> (cercle), et <i>Escherichia coli</i> (triangle) en contact avec l'extrait AS-3000 aux concentrations 0.313, 0.625, 1.25, and 2.5 mg ml ⁻¹ pendant 6 h (noir) et 18 h (blanc) à 30°C.....	82
Figure 5: Morphologie de <i>Listeria ivanovii</i> et <i>E. coli</i> en présence de l'extrait AS-3000	83
Figure 6: Effet post-antibiotique (PAE) de l'extrait AS-3000 seul (triangle), ampicilline seul (carré), et leur combinaison (croix) sur <i>L. ivanovii</i> HPB28.....	84



Introduction

générale

1. Acquisition de résistance contre les antibiotiques et les fongicides

La résistance bactérienne face aux antibiotiques s'avère très préoccupante en ce début de millénaire. En fait, aucune espèce bactérienne connue parmi celles rencontrées en pathologie humaine et aucun antibiotique n'échappent aujourd'hui à ce phénomène. L'évolution et la progression de la résistance bactérienne aux grandes classes d'antibiotiques découlent de quatre principaux facteurs. Tout d'abord, l'utilisation abusive des antimicrobiens a exercé une forte pression sélective sur les populations bactériennes. Ainsi, les antibiotiques ont enclenché le processus de l'évolution en créant un nouveau facteur de sélection naturelle. Les microorganismes possédant des gènes de résistance ou d'évasion face aux molécules destructrices ont été les seuls à survivre et à se multiplier dans les environnements traités. Ainsi, les populations résistantes ont spontanément pris le dessus sur les souches bactériennes sensibles et leur domination s'amplifie au gré de l'utilisation des antibiotiques. Une seconde cause d'évolution de la résistance réside dans la capacité stupéfiante des microorganismes à se propager. La dissémination des grands clones épidémiques tels que les *Staphylococcus aureus* résistants à la méthycilline (SARM) et les Entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) propagent la problématique à travers le globe (Normark et Normark 2002). De plus, le mode de vie actuel et la croissance démographique combinés aux déplacements à grande vitesse augmentent les contacts humains. En troisième lieu, le vieillissement de la population accompagné de l'augmentation des cas de cancers et de la propagation du VIH accroît considérablement les populations humaines immunodéprimées. Ce phénomène favorise l'émergence d'infections opportunistes causées par des microorganismes de la flore normale tels que *P. aeruginosa* et *S. aureus*. Ces derniers subsistent dans le corps humain donc ils se trouvent fréquemment en contact avec des antibiotiques et, par le fait même, sont souvent résistants. Finalement, l'utilisation d'analogues d'antibiotiques employés en médecine humaine dans la supplémentation nutritionnelle animale a favorisé l'avenue d'une résistance croisée pour nos antibiotiques (Witte 1997). Face à la résistance croissante des microorganismes pathogènes aux antibiotiques classiques, la réduction de la menace infectieuse passe par la prévention mais aussi par de nouvelles armes, parmi lesquelles les «peptides antimicrobiens ».

Dans un autre contexte, les maladies des plantes causées par des virus, des bactéries et des champignons affectent les cultures, et sont responsables de pertes importantes ou de

diminutions de la qualité et de la sécurité des produits agricoles. Le contrôle de ces maladies repose principalement sur les pesticides chimiques ([Agrios, 2005](#)). Dès les années 90, l'Union européenne, les États-Unis et plusieurs autres pays ont entrepris des modifications de la réglementation des pesticides conduisant à l'interdiction de plusieurs de ces derniers. La mise en œuvre de cette interdiction a conduit à la réémergence de certaines maladies sur des végétaux d'importance économique. Ces maladies sont gérées avec difficulté en raison de l'absence de composés anti-infectieux efficaces.

2. Intérêts d'étude des peptides antimicrobiens

Au cours des dernières années, les peptides antimicrobiens (PAM) font l'objet d'attention comme candidats à des produits phytopharmaceutiques. Ces peptides sont de courte séquence, avec généralement moins de 50 résidus d'acides aminés dans les systèmes vivants, qui sont une première ligne de défense chez les plantes et les animaux.

2.1. Applications agronomiques

L'introduction sur le marché de végétaux à caractères nouveaux issus de la biotechnologie est une activité relativement récente dont l'impact est déjà considérable sur l'agriculture partout dans le monde. Plusieurs peptides antimicrobiens sont appliqués pour rendre des plantes résistantes aux bactéries et champignons phyto-pathogènes et réduire ainsi l'utilisation de pesticides chimiques toxiques pour l'environnement. L'application directe sur la plante d'une quantité efficace de peptides antibactériens et/ou antifongique ou d'une composition en contenant représente une première forme de mise en œuvre de l'application agronomique. Une deuxième forme de mise en œuvre de cette application est basée sur des techniques de transgénèse consistant à incorporer de façon stable dans l'ADN d'une cellule végétale, une séquence polynucléotidique codant pour un ou plusieurs peptides ci-dessus. Les cellules végétales ainsi transformées permettent de régénérer une plante transmettant le caractère de résistance aux infections bactériennes et/ou fongique à sa descendance. A titre d'exemples de plantes, on peut citer le riz, le maïs, le colza, la betterave, le blé, le tabac, la tomate, la pomme de terre, etc. Quelques applications de plantes transgéniques exprimant des peptides antimicrobiens sont résumées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Quelques applications de plantes transgéniques exprimant des peptides antimicrobiens

(D'après Montesinos, 2007)

Origine	Peptide antimicrobien	Source	Plante transformée
Animal	Cécropine A, B	Hémolymphe de papillon	Riz
	Tachyplésine	Hémolymphe de crabe	Pomme de terre
	Héliomicine/drosomycine	Défensine d'insecte	Tabac
	Sarcotoxine IA	Hémolymphe de la mouche de fruit	Tabac
	Défensine de moule	Moule	Tabac
	Magainine	Peau de grenouille	Tabac
	Esculentine-1	Peau de grenouille	Tabac
Plante	Rs-AFP2	Défensine Radis	Tabac/tomate
	Alf-AFP	Défensine de luzerne	Pomme de terre
	Spi1	Défensine d'épinette	Tabac
	DRR230-a	Défensine de petit pois	Canola/tabac
	BSD1	Défensine de chou	Tabac
	WT1	Défensine de Wasabi	Riz
	Dm-AMP1	Défensine de Dahlia	Aubergine
	Mj-AMP1	Défensine de Jalapa	Tomate
	Pn-AMP	Héveine d' <i>Ipomoea nil</i>	Tabac
	Hordothionine	Orge	Tabac
Champignon	Alpha thionine	Orge	Tabac
	AFP	Défensine fongique	Riz
Synthétique	SB-37	Analogue de cécropine	Pomme de terre, pomme
	Shiva-1	Analogue de cécropine	<i>Anthurium, Paulownia</i>
	SB37, Shiva-1	Analogue de cécropine	Tabac
	MB-39	Analogue de cécropine	Pomme
	MsrA1	hybride de cécropine-mélittine	Pomme de terre
	MSI-99	Analogue de magainine	vigne/banane
	Myp30	Analogue de magainine	Tabac
	Rev4	analogue d'indolicidine	Tabac/arabidopsis
	D4E1	Synthétique	Tabac/coton

2.2. Applications thérapeutiques

Face aux nouveaux problèmes thérapeutiques liés à l'apparition de pathogènes résistants, l'industrie pharmaceutique est maintenant mise au défi de développer des familles d'antibiotiques réellement innovantes. Plusieurs peptides antimicrobiens ou dérivés sont actuellement en cours de développement clinique (Hancock, 2000; Andres et Dimarcq, 2004). Le premier peptide antimicrobien, développé dans les années 90, est un dérivé de la magainine : le Pexiganan (Magainin Pharmaceuticals, Philadelphie, Etats-Unis) (Jacob et

Zasloff, 1994). Dans une étude de phase III, ce peptide incorporé dans une crème s'est révélé tout aussi efficace qu'une antibiothérapie orale par ofloxacine dans le traitement d'ulcérations cutanées surinfectées chez des diabétiques (Lamb et Wiseman, 1998) ; pour chacun des bras de l'essai, 18 à 30 % des lésions étaient cicatrisées au terme de 6 semaines de traitement.

Parmi les autres peptides anti-infectieux en développement avancé et donc susceptibles d'intéresser le clinicien dans les années à venir, il convient de citer : l'Isegean développé par Intrabiotics Pharmaceuticals (Mountain View, Etats-Unis) (Bellm et al., 2000), les peptides MBI de Micrologix Biotech (Vancouver, Canada) et les peptides dérivés de l'histatine de Periondotix (Pittsburgh, Etats-Unis) (Paquette et al., 2002). L'Isegean, un analogue synthétique de la protégrine I (IBL-367), est actuellement en étude de phase III dans les mucites chimio-induites sous la forme de bains de bouche (Bellm et al., 2000), ce peptide initié 4 jours avant une allogreffe de moelle ayant réduit l'incidence des mucites de 22 % et leur sévérité de 40 % dans une étude préalable de phase II. Les peptides MBI, analogues de l'indolicidine, et tout particulièrement le MBI-226, sont en cours d'étude de phase III dans le cadre de la prévention des infections cutanées et de cathéters centraux, notamment par *S. aureus* et *Candida albicans*. Enfin, des peptides dérivés de l'histatine, présents dans la salive humaine, sont actuellement en étude clinique (de phases II-III) en prévention et traitement des gingivites et des affections périodontales (Paquette et al., 2002). Dans une étude randomisée en double aveugle chez 106 sujets, des dérivés de l'histatine se sont révélés plus efficaces que le placebo dans la prévention de gingivites expérimentales (Paquette et al., 2002).

Il est clair, que la caractérisation de molécules naturelles ayant des propriétés anti-infectieuses, représente toujours une stratégie de découverte prometteuse. Dans cette perspective, les peptides antimicrobiens cationiques se profilent comme étant des candidats particulièrement originaux avec lesquels il faut maintenant compter (Gura, 2001). Cependant, plus de 14 ans après la création de la première société spécialisée dans le développement des peptides antimicrobiens, Magainin pharmaceuticals et malgré le nombre sans cesse croissant de nouveaux peptides caractérisés, aucun composé appartenant à cette catégorie n'est encore commercialisé. Le développement des peptides antimicrobiens doit encore faire face à plusieurs défis dont le principal est technologique et concerne la production à grande échelle, à des coûts compatibles avec les exigences de l'industrie pharmaceutique.

3. Les peptides antimicrobiens chez les êtres vivants

Les peptides antimicrobiens sont des antibiotiques naturels et sont des composants clefs des systèmes de la défense immunitaire innée, non-adaptative des organismes multicellulaires animaux et végétaux (Hoffmann et al., 1999; Ganz et Lehrer, 1998; Lehrer et Ganz, 1999). Il s'agit d'un ensemble de petites protéines, comportant en moyenne de 20 à 50 acides aminés, qui partagent un caractère cationique et des propriétés amphiphiles. A présent, plus de 750 différents peptides antimicrobiens ont été identifiés dans divers organismes couvrant les procaryotes, les plantes, les insectes, et les animaux (y compris les êtres humains) (Boman, 1998; Lehrer et Ganz, 1996; Garcia-Olmedo et al., 1998; Wong et al., 2007).

3.1. Les peptides antimicrobiens chez les procaryotes

La découverte des substances antimicrobiennes d'origine biologique remonte à 1877, lorsque Pasteur et Joubert ont mis en évidence un antagonisme entre *Escherichia coli* et *Bacillus anthracis*, dans l'urine d'animaux infectés expérimentalement. En 1925, Gratia appela "colicines", des substances antimicrobiennes sécrétées par *E. coli* φ et actives contre *E. coli* V. En 1928, Rogers a rapporté pour la première fois une substance antimicrobienne produite par *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* autre que les acides organiques et le peroxyde d'hydrogène. Cette substance a été identifiée plus tard par Hirsch (1951), qui a démontré sa nature protéique et l'a nommée "nisine". En 1953, Jacob et ces collaborateurs proposèrent le terme plus général de bactériocine à ces substances. Ce terme a été utilisé à l'origine pour désigner toute protéine à activité antibiotique de type "colicine", caractérisée par une activité létale, et un spectre d'action restreint à des bactéries étroitement apparentées. Les bactériocines sont produites par une vaste gamme d'espèces bactériennes et elles pourraient jouer un rôle dans la colonisation et/ou la défense d'une niche écologique. Une base de données décrivant ces molécules, BACTIBASE, a été créée par notre groupe (Hammami et al., 2007).

3.2. Les peptides antimicrobiens chez les plantes

La découverte du premier peptide antimicrobien chez les organismes eucaryotes remonte à l'année 1942 lorsque Balls et collaborateurs ont purifié l'α-purothionine extrait du blé. Le prochain peptide n'a été découvert que 30 ans plus tard, et depuis, cette catégorie de molécules suscite l'intérêt des chercheurs. Ainsi, plusieurs études décrivant la découverte de nouveaux peptides antimicrobiens de tissus de la plante ont été rapportées (Broekaert et al.,

1995). Les peptides antimicrobiens des plantes sont des molécules à séquences courtes (<100 AA), riches en résidus cystéines (cystein rich protein CRP). Ces molécules partagent des caractéristiques générales communes (comme une charge globale positive, la présence de ponts disulfure) et sont regroupées en plusieurs familles telles que les α -défensines, les thionines, les protéines de transfert de lipides (LTPs), les cyclotides, les snakines et les héveines (Garcia-Olmedo et al., 1998).

3.3. Les peptides antimicrobiens chez les invertébrés

Plusieurs phylums d'invertébrés constituent des sources riches de peptides antimicrobiens. Parmi ces animaux, les insectes sont sans doute les plus représentés avec plus de 150 peptides découverts (Steiner et al., 1981 ; Bulet et al., 1999). Ces cécropines, sont des peptides amphipathiques, linéaires, de 3 à 4kDa, et sont actifs contre les parasites protozoaires, les bactéries et les champignons (Hoffmann et al., 1999; Vizioli et Salzet, 2002). La mouche *Drosophila melanogaster* a servi comme modèle d'étude pour l'analyse de la réponse à l'invasion pathogénique chez les insectes. Ainsi, plusieurs peptides ont été découverts tels que la drosomycine, cécropines, diptéricine, drosocine, attacine and metchnikowine. Les peptides drosomycine et metchnikowine présentent une activité antifungique alors que les autres exhibent des propriétés antibactériennes (Hoffmann et al., 1999). A partir du venin de la fourmi *Pachycondyla goeldii*, 15 peptides différents ont manifesté des activités antibactériennes et insecticidales. Ces peptides sont appelés ponéricidines, ayant une taille entre 1.8 to 3.3 kDa et présentent des similarités de séquences avec les cécropines, méllitines and dermaseptines (Orivel et al., 2001). Parmi les peptides antimicrobiens d'insectes, les défensines représente une large famille qui a été initialement isolée à partir de *Sarcophaga peregrina* (Matsuyama et Nafori, 1988) et de *Phormia terraenovae* (Lambert et al., 1988). Cette grande famille de peptides est constituée de 34 à 46 résidus à l'exception de la défensine d'abeille (51 résidus) (Dimopoulos et al., 1997). La mélittine, peptide à 26 résidus isolé du venin de l'abeille *Apis mellifera*, exerce à la fois des activités antimicrobiennes et hémolytiques. Toutes ces défensines d'insectes partagent un motif consensus composé de six cystéines formant des ponts disulfure intramoléculaires.

A part les insectes, d'autres invertébrés produisent des peptides antimicrobiens. Ehret-Sabatier et ses coll. (1996) ont isolé à partir du scorpion *Androctonus australis* l'androctonine, un peptide antimicrobien de 25 résidus. Ce peptide est actif contre les bactéries Gram-positive et Gram-négative ainsi que les champignons. Destoumieux et ses collègues (2000) ont purifié trois peptides à partir de l'hémolymphé de crevette, *Penaeus*

vannaei. Ces penaeidines, sont des peptides de 5.4 à 6.6 kDa qui manifestent une activité contre les champignons filamenteux (Destoumieux et al., 1999).

3.4. Les peptides antimicrobiens chez les vertébrés

Chez les vertébrés supérieurs, les peptides antimicrobiens sont localisés essentiellement à l'intérieur des phagocytes ou dans les produits de sécrétion des muqueuses digestive, respiratoire et génitale. Les peptides antimicrobiens présentent trois propriétés fondamentales: une charge cationique, un caractère amphipatique et une absence de toxicité relative vis-à-vis des cellules eucaryotes. A ce jour, plusieurs centaines de peptides antimicrobiens ont été isolés et rassemblés, en fonction de leur structure, dans quelques grandes classes ou familles. Initialement, les défensines ont été découvertes chez granulocytes de lapins et sont définies comme de petits peptides antimicrobiens cationiques (Zeya et Spitznagel, 1966). Cette grande famille regroupe des peptides ayant de 29 à 35 résidus d'acides aminés liés avec trois ponts disulfures. L'être humain secrète six défensines. Parmi ces peptides, quatre sont exprimés par les granulocytes et certains lymphocytes et sont appelés peptides de neutrophiles humains (HNP 1-4). Deux autres peptides antimicrobiens humains (DH-5 et 6) sont exprimés par les cellules de paneth intestinales (Ouellette et Bevins, 2001). Chez l'être humain, les cathélicidines CAP-18 et LL-37 sont deux peptides identifiés dans les testicules (Agerberth et al., 1995), l'épithélium squameux et différentes populations lymphocytes et monocytes (Agerberth et al., 2000). D'autres membres de la famille des cathélicidines ont été isolés chez le mouton (SMAP-29) et le bœuf (BMAP-28, les bacténécines Bac-5 et Bac-7), et présentent des activités antimicrobiennes diverses (Skerlavaj et al., 1996 ; Skerlavaj et al., 1999). Des chercheurs ont isolés à partir des neutrophiles de porc des peptides de 2 kDa, les protégrines, composés de 16 à 18 acides aminés (Shi et Ganz, 1998). Ces peptides agissent au niveau de la membrane bactérienne et sont capables de conserver leur activité en présence de concentrations physiologiques de chlorure de sodium. Une autre famille de peptides appelée histatines (protéines riches en histidine) a été extraite de la salive humaine. Ce groupe de peptide montre une activité modérée contre *C. albicans* (Tsai et Bobek, 1998).

4. Structure des peptides antimicrobiens

Au cours des dernières décennies, la structure de nombreux peptides antimicrobiens a été résolue par résonance magnétique nucléaire (RMN) et par cristallographie. Malgré leur diversité, les peptides antimicrobiens peuvent être répertoriés dans cinq familles de peptides :

à structure en hélice α , à structure en feuillet β , riches en résidus cystéine, à forte répétition de certains acides aminés, ou contenant des acides aminés modifiés.

4.1. Les peptides antimicrobiens à structure en hélice α

En 1981, Steiner et ses collaborateurs ont rapportés les deux premiers peptides antimicrobiens à structure α -hélicoïdale : les cécropines A et B, isolées à partir du papillon *Hyalophora cecropia*. Plus tard, d'autres cécropines ont été découvertes dans les insectes et même dans les mammifères comme la cécropine P1 isolée à partir de l'intestin de porc (Lee et al., 1989). Toutes les cécropines ont tendance à se structurer en hélice α dans certains solvants organiques tels que le trifluoroéthanol (Cammers-Goodwin et al., 1996). Des études de RMN sur la cécropine A ont montré que cette molécule adopte une forme α -hélicoïdale en présence de 15% d'alcool hexafluoroisopropyle (Holak et al., 1988). Cette structure est caractérisée par une hélice α amphiphile ayant des surfaces hydrophobe et cationique, caractéristiques observées dans plusieurs peptides antimicrobiens. En 1987, Zasloff a isolé partir de la peau de grenouille *Xenopus laevis* les maganines, peptides à 23 résidus d'acides aminés structurés en hélice α amphiphile dans 25% de trifluoroéthanol (Marion et al., 1988).

4.2. Les peptides antimicrobiens à structure en feuillet β

Cette classe de peptides se compose d'environ 20 acides aminés adoptant une structure en épingle à cheveux stabilisée par un à deux ponts disulfures. Parmi cette classe, la tachyplésine et la polyphemusine II, peptides de limule, adoptent un motif d'épingle à cheveux stabilisé par deux ponts disulfures (Kawano et al., 1990; Tamamura et al., 1993). Des études de RMN ont montré que la tachyplésine possède une structure très similaire aux protégrines, peptides isolés à partir de leucocytes de porc. Toutes ces molécules forment des feuillets β antiparallèles connectés par un coude β et stabilisés par deux ponts disulfures (Tamamura et al., 1993). Un membre de structure atypique à ce groupe a été identifié chez la plante *Impatiens balsima*. Bien qu'Ib-AMP1 possède le coude β et les deux ponts disulfures, il forme une structure antiparallèle étendue différente à celle des feuillets β (Patel et al. 1998). D'autre part, la lactoferricine B, un peptide antimicrobien dérivé de la protéolyse de la lactoferrine, se compose de 25 acides aminés structurés en feuillet β stabilisé par un seul pont disulfure (Hwang et al., 1998). Tous les peptides de cette famille étudiés par RMN liquide montrent une structure monomérique. Toutefois, Roumestand et ses coll. (1998) ont observé la dimérisation et l'oligomérisation des molécules de protégrine-1 en présence de micelles de dodecylphosphocholine. Il paraît que la nature cationique de la protégrine l'empêche de

dimériser en solution, son interaction avec les phospholipides anioniques rendrait cette dimérisation possible.

4.3. Les peptides antimicrobiens riches en cystines

Cette classe de peptides a été initialement identifiée chez les neutrophiles humains (HNP-1, 2 et 3) (Ganz et al., 1985). Identifiées chez les mammifères (Eisenhauer et al., 1992), les insectes (Hoffmann et Hetru 1992; Landon et al., 1997), et les plantes (Broekaert et al., 1995), ces α -défensines sont généralement composées de 29 à 47 résidus d'acides aminés dont six cystéines liés selon le motif consensus suivant : C1–C4, C2–C5 et C3–C6. Généralement, la structure des α -défensines consiste en trois feuillets β antiparallèles. Un autre groupe de peptides antimicrobiens appartenant à cette classe, les β -défensines, a été isolé à partir des neutrophiles bovins (Selsted et al., 1993). Malgré que ces derniers possèdent un motif de ponts disulfures différent à celui des α -défensines, leur repliement global reste identique. Plusieurs défensines-like ont été répertoriées, parmi lesquels les γ -thionines (Mendez et al., 1990; Colilla et al., 1990) et la drosomycine (Landon et al., 1997). Ces différentes molécules sont formées de trois feuillets β antiparallèles dont les deux premiers sont séparés par une hélice α , et connectés par quatre ponts disulfures.

4.4. Les peptides antimicrobiens à forte répétition de certains acides aminés

Certains peptides antimicrobiens présentent dans leur structure primaire un nombre particulièrement élevé de certains acides aminés. La conformation de ce type de peptides diffère de celles des peptides à structure en hélice α ou en feuillet β . A l'exemple, l'histatine, peptide isolé de la salive humaine est riche en résidus histidine et est actif contre *Candida albicans* (Xu et al., 1991). D'autres cas sont reportés tels que les cathélicidines et les bacténecines (Bac-5 et 7) (Gennaro et al., 1989) riches en proline, les indolicidines (Selsted et al., 1992) et la tritripticine (Lawyer et al., 1996) riches en tryptophane, la prophenine-1 (Harwig et al. 1995) riche en phénylalanine et le peptide PR-39 riche en arginine (Agerberth et al., 1991). Des expériences de dichroïsme circulaire ont montré que l'indolicidine a une conformation aléatoire en solution, mais devient plus structurée dès sa fixation sur les phospholipides (Ladokhin et al. 1997).

4.5. Les peptides antimicrobiens contenant des acides aminés modifiés

Les peptides antimicrobiens peuvent comporter dans leur structure des acides aminés modifiés rares. Cette classe est essentiellement produite par les bactéries. La nisine est un

peptide lantibiotique produit par *Lactococcus lactis* et composé d'acides aminés rares tel que la lanthionine, la 3-méthyllanthionine, la dehydroalanine et la dehydrobutyrine (De Vos et al., 1993). Ce peptide est remarquablement actif contre les bactéries Gram-positives. En solution aqueuse, la nisine ne montre pas de structure définie; par contre elle se structure en coudes β dès sa fixation à aux dodecylphosphocholines (Van Den Hooven et al., 1996). Isolé de *Leuconostoc gelidum*, la leucocine A, un peptide de 37 résidus d'acides aminés, présente une conformation amphiphile bien structurée (Fregeau Gallagher et al., 1997). D'autres peptides non ribosomaux peuvent être détectés, tel que la gramicidine A (Cross 1997), la gramicidine S, et l'alamethicine (Franklin et al. 1994; North et al. 1995). Les gramicidines contiennent plusieurs acides aminés du type D; ce qui permet par exemple à la gramicidine A d'adopter une conformation β -hélicoïdale inusuelle (Ketchem et al. 1993).

5. Mécanismes d'action des peptides antimicrobiens

5.1. Activité antibactérienne

Bien que le mécanisme d'action exact des peptides antimicrobiens reste un sujet de controversie, il est établi que ces peptides, de structure amphiphile, perturbent sélectivement la membrane cellulaire. La charge cationique permet aux peptides antimicrobiens d'interagir avec les charges négatives des phospholipides des membranes bactériennes. Cette interaction électrostatique peut se faire avec les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries gram-négative ou avec le peptidoglycane des bactéries gram-positives (Epanet Vogel, 1999). Après leur fixation, les peptides antimicrobiens s'insèrent aux phospholipides de membrane bactérienne via un des trois modèles 'douve de tonneaux' (barrel stave), 'pores toroïdaux' (toroidal-pore) ou 'tapis' (carpet). Récemment, d'autres mécanismes d'action ont été proposés et dans lesquels les peptides antimicrobiens n'interagissent pas avec la membrane cytoplasmique. Dans ce cas, les peptides antimicrobiens agiront plutôt au niveau du cytoplasme en inhibant la synthèse des acides nucléiques et/ou des protéines, ou en entravant l'activité enzymatique bactérienne.

5.1.1. Modèle 'douve de tonneaux' ou 'barrel stave'

Dans le modèle 'douve de tonneaux' (Figure 1) la formation de pores/canaux transmembranaires se fait par assemblage de plusieurs peptides en forme d'hélices amphiphiles. Alors que les résidus hydrophobes de ces peptides se retrouvent en contact direct avec les lipides de la membrane, les résidus polaires (hydrophiles) se retrouvent au centre de

la molécule assemblée et forment ainsi un pore aqueux (Yang et al., 2001; Ehrenstein et Leca, 1977). La formation des pores transmembranaires se fait sur plusieurs étapes incluant la fixation des monomères de peptides hélicoïdaux perpendiculairement à la membrane, suivie par l'insertion des hélices peptidiques dans le cœur hydrophobe de la membrane. L'addition progressive d'autres monomères induit une augmentation du diamètre du pore, ce qui conduit à la fuite du contenu cytoplasmique et la mort de la cellule.

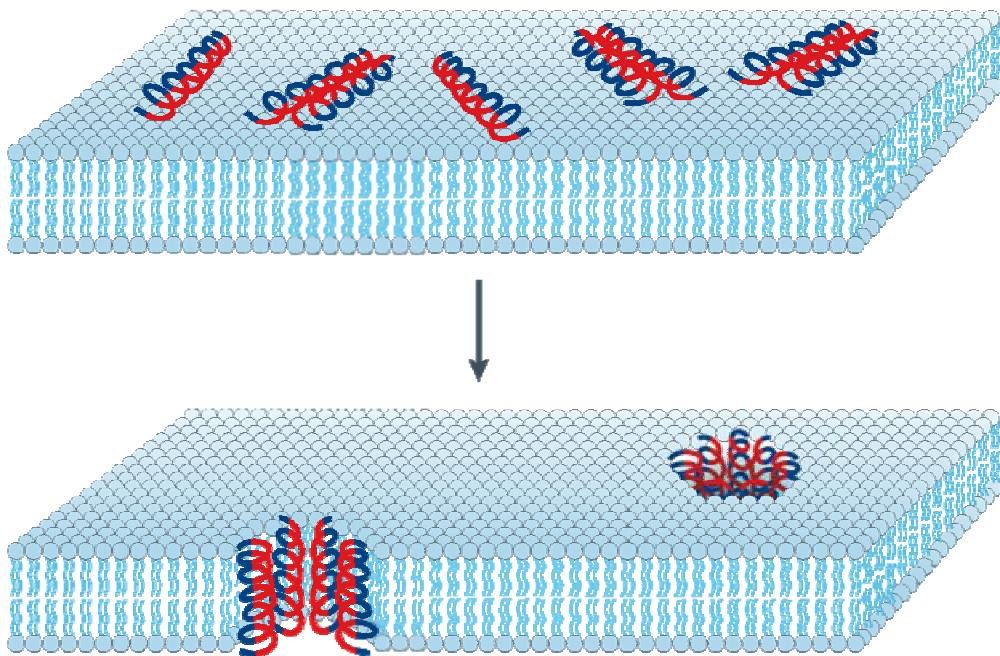


Figure 1: Le modèle ‘douve de tonneaux’ (barrel stave).

Les régions hydrophiles des peptides sont colorées en rouges, les régions hydrophobes en bleue (d'après Brogden, 2005).

5.1.2. Modèle ‘pores toroïdaux’ ou ‘toroidal-pore’

Le ‘pore toroïdaux’ (Figure 2) diffère du modèle précédent par le fait que les peptides restent toujours fixés à la tête des monocouches lipidiques même quand ils sont insérés perpendiculairement dans la bicouche lipidique (Matsuzaki et al., 1996; Yang et al., 2001). Ce type de pore transmembranaire a été démontré dans le cas des maganines, protégrines et de la mélittine (Yang et al., 2001; Matsuzaki et al., 1996; Hallock et al., 1996).

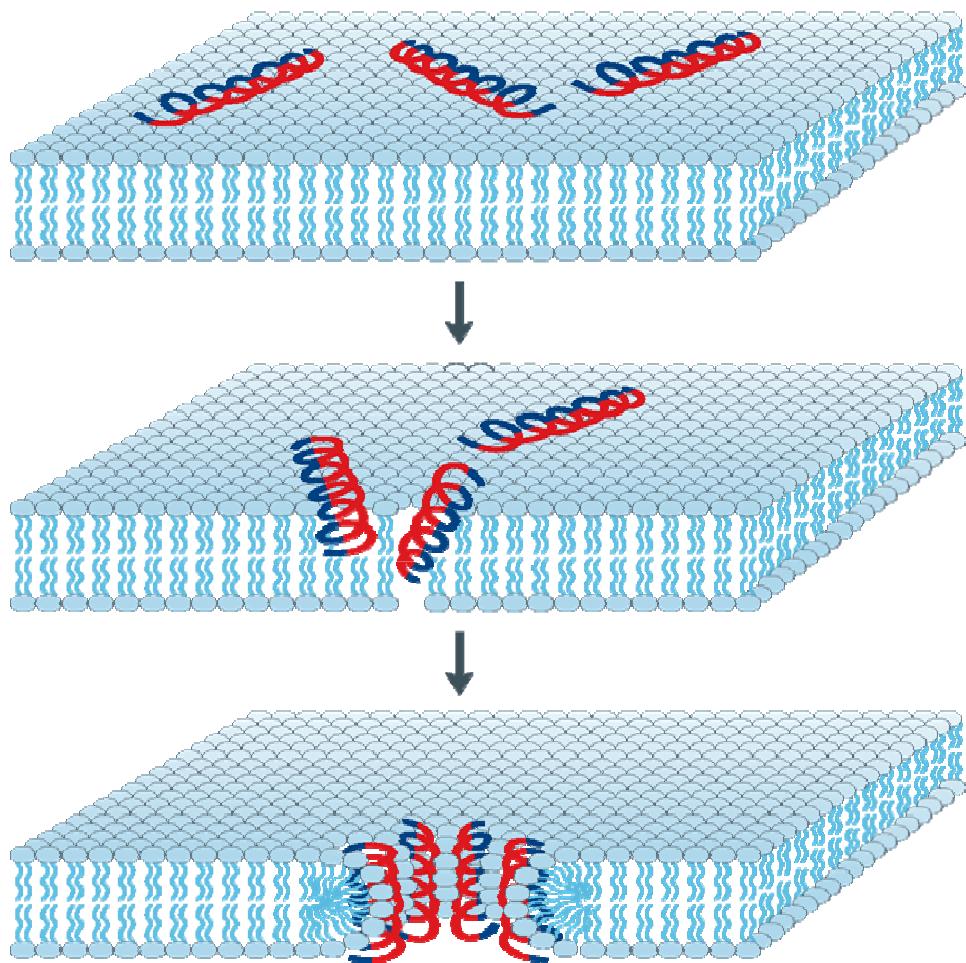


Figure 2: Le modèle ‘pores toroïdaux’ (toroidal-pore).

Les régions hydrophiles des peptides sont colorées en rouges, les régions hydrophobes en bleue (d’après Brogden, 2005).

5.1.3. Modèle ‘tapis’ ou ‘Carpet’

Ce modèle a été proposé la première fois pour décrire le mode d’action de la dermaseptine (He et al., 1996). Dans ce modèle de type détergent, les peptides se fixent à forte concentration à la surface de la membrane et la couvrent comme un tapis. Les peptides ne sont pas insérés à l’intérieur de la membrane et ne forment pas de pores. Après leur fixation sur les phospholipides, les monomères de peptides s’alignent sur la surface de la membrane et s’accumulent induisant une perturbation de la membrane qui finit par être perforée et son contenu cytoplasmique échappé (Ehrenstein et Leca, 1977) (Figure 3).

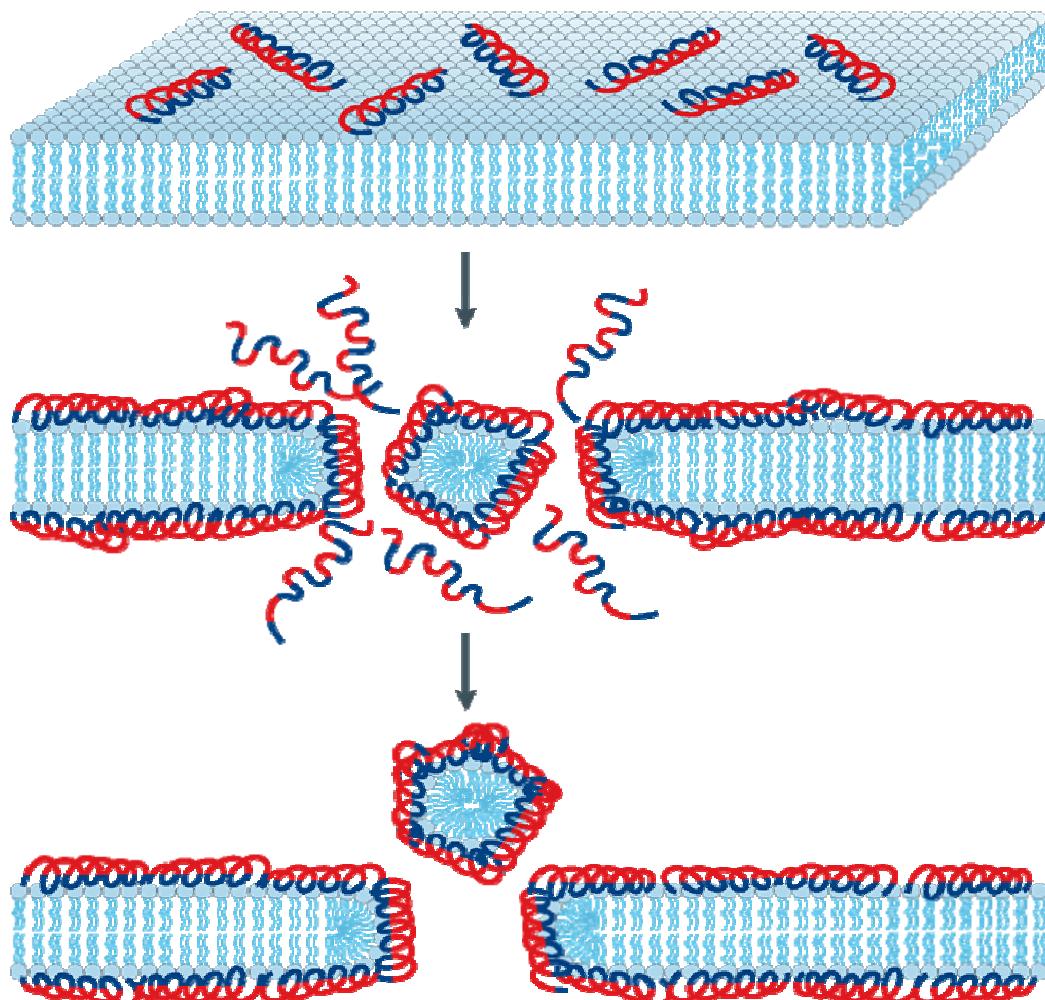


Figure 3: Le modèle tapis (carpet).

Les régions hydrophiles des peptides sont colorées en rouges, les régions hydrophobes en bleue (d'après Brogden, 2005).

5.1.4. Mécanismes d'action sans perturbation de la membrane cellulaire

Certains peptides ne semblent pas agir sur les membranes mais sur des cibles cytoplasmiques. Par des analyses de translocation, il a été montré que les peptides riches en arginine étaient capables à la fois d'être transportés à travers la membrane plasmique, mais également à travers l'enveloppe nucléaire (Powers et Hancock, 2003). Après leur passage à travers la membrane cellulaire, ces peptides agissent soit en inhibant la synthèse de la membrane cellulaire, de l'ADN, de l'ARN ou des protéines. D'autres peptides comme les histatines agissent plutôt en inhibant l'activité enzymatique. Ces différents mécanismes sont résumés dans la figure 4 (d'après Brogden, 2005).

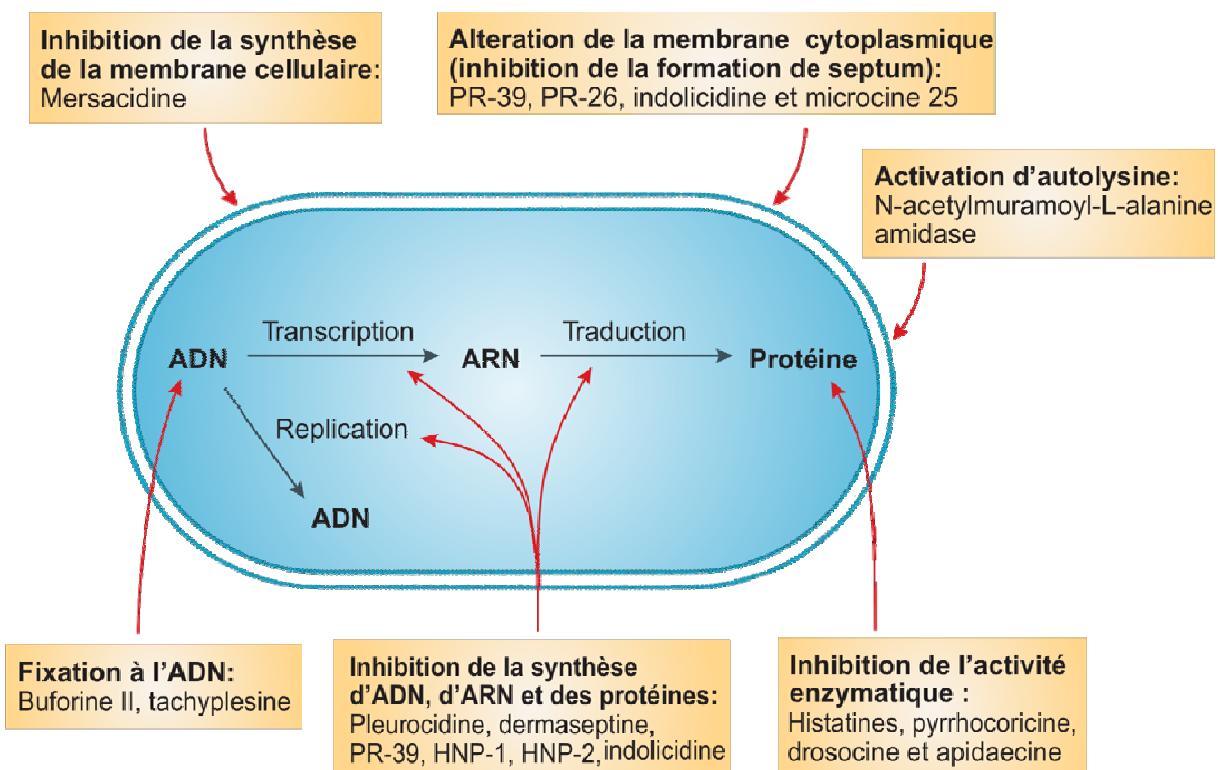


Figure 4: Différents mécanismes d'action antimicrobiens sans interaction avec la membrane bactérienne

(d'après Brogden, 2005)

5.2. Activité antifongique

Les mécanismes d'action antifongiques sont peu identifiés. Toutefois, Plusieurs travaux ont reportés que l'action des peptides antifongiques se situe essentiellement au niveau de la membrane des champignons via les même mécanismes décrits pour les cellules bactériennes. Un modèle du mécanisme d'action des défensines de plantes a été établi par Thevissen et coll. (2003a) (Figure 5). Les peptides antifongiques se fixent sur la membrane plasmique des cellules fongiques au niveau des sphingolipides, cas de DmAMP1, une défensine extraite de *Dahlia merckii* (Thevissen et al., 2003b). Après fixation du peptide antimicrobien sur la membrane fongique, la perméabilité de cette dernière est altérée, créant d'importants influx d'ions Ca^{2+} et efflux d'ions K^+ . Jusqu'à ce jour, aucun mécanisme clair d'action intracellulaire n'a été proposé.

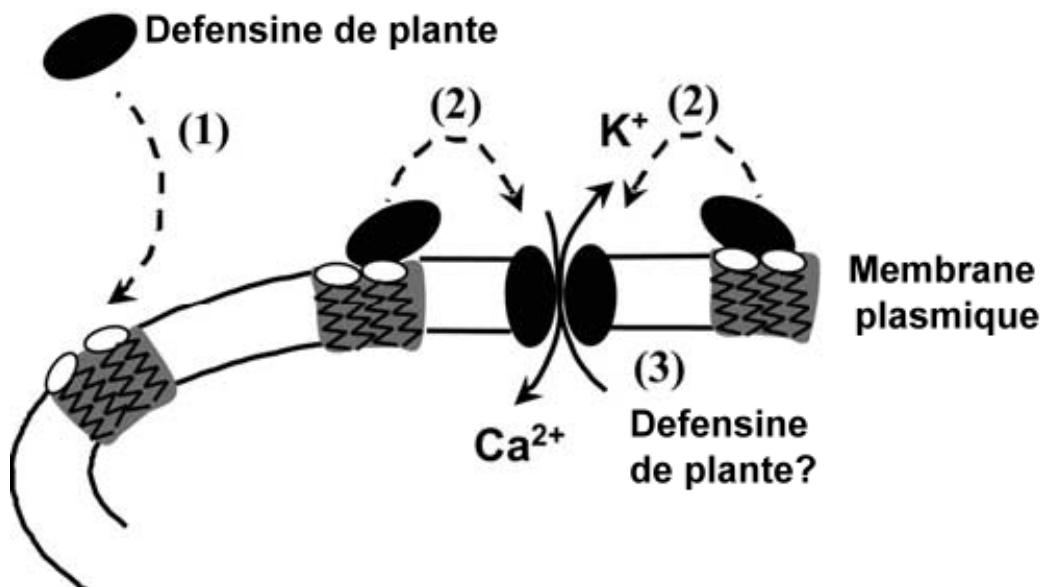


Figure 5: Modèle du mode d'action des peptides antifongiques

(d'après Thevissen et al., 2003a)

⁽¹⁾ Les défensines de plantes sont représentées par des formes ovales (noir), ⁽²⁾ se lient aux sphingolipides de la membrane plasmique des champignons, induisant ainsi une modification de la perméabilité de la membrane caractérisée par ⁽³⁾ une augmentation de l'absorption du Ca^{2+} et l'efflux du K^+ .

5.3 Activité antivirale

Le cycle viral se compose de plusieurs étapes incluant l'attachement du virus sur des récepteurs de la membrane cellulaire, sa pénétration (endocytose), sa décapsidation et sa réplication (transcription et traduction des protéines précoces de régulation; synthèse des acides nucléiques viraux; production des protéines virales tardives structurales). Il semble que les peptides antiviraux agissent sur tous les stades de réplication du virus. Le peptide antiviral peut interagir avec les glycosaminoglycans membranaires (proposées comme site de fixation de certains virus) bloquant ainsi la pénétration du virus dans la cellule hôte (WuDunn et Spear, 1989; Shieh et al., 1992). Ceci est le cas de l' α -défensine humaine LL-37 et de la magainine qui interagissent avec différentes molécules de glycosaminoglycans (James et al., 1994 ; Schmidtchen et al., 2001; Schmidtchen et al., 2002). Un autre mécanisme est proposé pour l'interféron- γ qui agit en bloquant la propagation des virus de cellule à cellule (Mikloska et Cunningham, 2001). D'autres peptides bloquent la pénétration virale par interaction soit avec des récepteurs cellulaires spécifiques ou avec des glycoprotéines virales. Ceci a été démontré pour un analogue de polyphemusine T22 qui se fixe sur le récepteur chimiotactique CXCR4, récepteur pour la pénétration du VIH-1 dans les cellules T (Murakami et al., 1997;

Tamamura et al., 1998). Un autre modèle d’interaction est reporté pour la tachyplésine-I dans lequel le peptide agit directement sur l’enveloppe virale (Murakami et al., 1991). Enfin, l’action de certains peptides antiviraux sur les étapes d’infection virale intracellulaire a été démontrée et plusieurs cas ont été rapportés. La cécropine A inhibe la multiplication du virus Junin par réduction spécifique de sa synthèse protéique (Albiol-Matanic et Castilla, 2004). A un stade précoce, la réPLICATION du VIH-1 est inhibée par la protégrine-1 (Steinstraesser et al., 2005). De même, l’indolicidine inhibe l’activité de l’intégrase du VIH-1 (Krajewski et al., 2004).

6. Classification des peptides antimicrobiens d’origine végétale

Plusieurs familles de peptides antimicrobiens ont été caractérisées chez les plantes. La majorité d’entre eux sont de petits peptides riches en cystéines qui forment des ponts disulfures assurant une structure spatiale globulaire. Généralement, ces molécules possèdent une taille variant de 2 à 9 kDa, et adoptent des structures compactes stabilisées par 2 à 6 ponts disulfures. Ces peptides sont souvent codés par des familles multigéniques dont les différents gènes présentent des particularités tissulaires d’expression, certains gènes étant par ailleurs induits par les pathogènes, alors que d’autres sont d’expression constitutive (Broekaert et al., 1995; Garcia-Olmedo et al., 1998). Parmi ces peptides antimicrobiens, on distingue, entre autres, les thionines, les défensines, les nsLTP (non specific Lipid Transfer Protein, Garcia-Olmedo et al., 1995), les snakines (Segura et al., 1999; Berrocal-Lobo et al., 2002), les héveines et les knottines.

6.1. Les thionines

Les thionines, appelées ainsi à cause de leur riche teneur en soufre (Balls et al., 1942), comprennent les purothionines, premières d’entre elles découvertes dans les grains de blé (Balls et al., 1942), les α et β hordothionines de l’orge et de l’avoine (Gausling, 1987), les viscotoxines responsables de la toxicité du gui (Samuelsson et Jayawardene, 1974) et d’autres peptides extraits de diverses espèces végétales. Peu après la découverte des purothionines, leurs propriété bactéricide et fongicide étaient caractérisées (Stuart et Harris, 1942). Les thionines sont des peptides de 45-47 acides aminés avec trois ou quatre ponts disulfures et sont généralement cationiques. Leur structure tridimensionnelle est bien conservée malgré des différences de séquence et du nombre de ponts disulfure. Elles ressemblent à la lettre grecque tau Γ avec deux hélices α antiparallèles formant le bras long et un feuillet β de deux brins antiparallèles, constituant le bras court. Elles sont amphiphiles, leurs résidus hydrophobes

étant regroupés sur la surface externe du bras long (Clore et al., 1986 ; Hendrickson et Teeter, 1981).

Selon leur séquence, cinq groupes peuvent être définis mais au niveau structural, trois groupes ont émergé sur la base du nombre et de l'arrangement des ponts disulfure. Le premier groupe contient les puro- et hordothionines ainsi que les peptides de *Pyrularia pubera* (Vernon et al., 1985) qui présentent quatre ponts disulfure en C1-C8, C2-C7, C3-C6, C4-C5. Le groupe 2 rapproche les viscotoxines, les phoratoxines de *Phoradendron tomatum* et les crambines (neutres) de *Crambe abyssinica* qui possèdent, toutes, trois ponts disulfures connectés en C1-C6, C2-C5, C3-C4. Enfin, le dernier groupe est formé de peptides tronqués des neuf acides aminés C-terminaux (Garcia-Olmedo et al., 1989) présentant la connectivité emboîtée typique des thionines pour leurs trois ponts. Le consensus Prosite correspondant aux thionines est C-C-X5-(R,K)-X2-(F,Y)-X2-C. Les thionines sont exprimées sous forme de précurseurs avec un peptide signal suivi de la protéine majeure puis d'un domaine C-terminal acide qui jouerait le rôle d'un neutralisateur acide de la toxicité du domaine basique effecteur pendant la synthèse protéique (Bohlmann et Apel, 1991). Elles peuvent être induites lors d'une infection bactérienne (Bohlmann et al., 1988; Epple et al., 1995). D'autre part, les thionines montrent diverses activités toxiques sur différents systèmes biologiques (Florack et Stiekema, 1994). En plus de leur toxicité sur de nombreux organismes, les thionines sont cytotoxiques pour les cultures cellulaires de mammifères ou d'insectes.

6.2. Les défensines

Les défensines des plantes sont des peptides cationiques de 45-54 acides aminés (environ 6 kDa) identifiés chez les Angiospermes et les Gymnospermes. Autrefois appelées γ -thionines, elles représentent toutefois un groupe structural distinct des thionines. De structure tridimensionnelle proche de celles des défensines d'insectes, elles ont été renommées défensines de plantes (Terras et al., 1995). Elles possèdent 8 cystéines formant quatre ponts disulfures interconnectés en C1-C8, C2-C5, C3-C6 et C4-C7, bien qu'un cinquième pont puisse être présent comme dans les défensines de fleurs de *Petunia hybrida* récemment caractérisées (Janssen et al., 2003 ; Lay et al., 2003). On distingue différentes classes selon leur structure primaire et leur activité (Osborn et al., 1995). Toutefois, malgré ces différences, elles partagent la même structure tridimensionnelle composée d'un feuillet β à trois brins antiparallèles et d'une hélice α (Almeida et al., 2002 ; Fant et al., 1998 ; Fant et al., 1999). Cette structure contient un motif Cs $\alpha\beta$ (cystein stabilized α helix - β sheet) qui correspond à la connection de deux ponts disulfures entre la séquence CxxxC de l'hélice et la séquence CxC

du brin C-terminal. Ce motif est commun à certaines neurotoxines de scorpions inhibitrices de canaux ioniques (Kobayashi et al., 1991) ainsi qu'aux défensines d'insectes (Cornet et al., 1995). Globalement, les défensines possèdent des activités biologiques diverses et peuvent être divisées en quatre groupes d'après leur activité antimicrobienne. Le groupe I inhibe les bactéries Gram+ et les champignons, entraînant un branchement particulier des hyphes (groupe morphogénique). Le deuxième groupe inhibe uniquement les champignons, sans changement de forme des hyphes (non morphogénique). Le groupe III est actif contre Gram+ et Gram-. Enfin, les peptides du groupes IV sont actifs sur les deux types bactériens et les champignons (action antifongique non morphogénique). Il existe également une classe de défensines inhibant les amylases ou les protéases. L'analyse de nombreuses séquences de défensines connues à ce jour, montre que la distinction en groupes basée sur l'activité ne se reflète pas au niveau des séquences (Thomma et al., 2002). Les défensines sont une famille multigénique de protéines transcrtes avec un peptide signal. En effet, les gènes de défensines codent pour une préprotéine avec un peptide signal permettant l'adressage des peptides. Treize gènes putatifs ont été identifiés chez *A. thaliana* qui se regroupent en deux sous familles (Thomma et al., 2002). Dans le cas des défensines de fleurs de pétunia et du tabac, ils spécifient en plus une partie C-terminale d'une trentaine de résidus, clivée lors de la maturation, et dont le rôle reste à déterminer (Lay et al., 2003).

6.3. Les snakines

Initialement identifiée chez les tubercules de pommes de terre, cette famille se distingue par la présence de 12 résidus cystéines. Ses deux premiers membres, snakine-1 et snakine-2 (Segura et al., 1999 ; Berrocal-Lobo et al., 2002) possèdent 63 et 66 résidus d'acides aminés et sont actifs contre une multitude de bactéries Gram+ et Gram- et de champignons. A ce jour, quelques gènes codant des protéines homologues aux snakines 1 et 2 sont caractérisés tels que les GASA-like (Roxrud et al., 2007).

6.4. Les héveines

Découvert en 1975 dans le latex de l'arbre de caoutchouc, la héveine est un peptide de 43 résidus d'acides aminés structuré en succession de trois feuillets β et d'une hélice α interconnectés par 4 ponts disulfures (Walujono et al., 1975). Riche en résidus glycine et cystéine, ce peptide contient le domaine de fixation aux chitines (chiting-binding domain), domaine qu'on trouve dans d'autres familles de protéines végétales telles que les lectines. Plutard, plusieurs peptides homologues à la héveine sont identifiés dont Pn-AMP1 et Pn-

AMP2 chez *Pharbitis nil* (Koo et al., 1998), Fa-AMP1 et Fa-AMP2 chez *Fagopyrum esculentum* (Fujimura et al., 2003), et Ee-CBP chez *Euonymus europaeus* (Van den Bergh et al., 2004). Les membres de cette famille partagent une structure amphiphile et cationique composée de 29 à 45 acides aminés dont 8 cystéines. Néanmoins des exceptions existent, Ac-AMP1 et Ac-AMP2 d'*Amaranthus caudatus* contiennent uniquement 6 cystéines suite à une délétion au C-terminal ; et inversement Ee-CBP, EAfp1 et EAfp2 possèdent 10 cystéines (Huang et al., 2002). Les peptides appartenant à cette famille exhibent une activité inhibitrice contre une multitude de phyto-pathogènes incluant des bactéries Gram+, Gram-, des champignons et des levures. Le mécanisme selon lequel ces peptides agissent sur leur cible reste méconnu.

6.5. Les knottines

Le motif cystine-knot, d'abord caractérisé en 1993 dans certains facteurs de croissance animaux (McDonald et Hendrickson, 1993) se retrouve dans de nombreux peptides de différentes origines (plantes, champignons, insectes, venins animaux). Toutefois, la structure de ces peptides ne se superpose pas parfaitement à celle des facteurs de croissance et on les distingue, en référence à leur activité inhibitrice, par le terme d'inhibiteurs à cystine-knot (ICK) ou knottines (Pallaghy et al., 1994). Les ICK animaux auraient une origine commune différente de celles des ICK végétaux et fongiques (Zhu et al., 2003). Toutefois, ces peptides possèdent tous de 26 à 48 résidus dont 6 cystéines formant trois ponts disulfures liés en C1-C4, C2-C5, C3-C6. Le motif cystine-knot est formé d'un feuillet β à trois brins antiparallèles et le nœud consiste en un anneau formé par les ponts C1-C4 et C2-C5 et le squelette du peptide à travers lequel passe le troisième pont. Le motif cystine-knot confère à ces peptides une structure robuste et compacte. Ce sont souvent des inhibiteurs de nombreuses protéines. Les knottines animales bloquent souvent des canaux tandis que les peptides végétaux agissent sur des enzymes. De nombreuses knottines de plante montrent des activités antibactériennes et antifongiques.

6.6. Les cyclotides

Les cyclotides représentent une grande famille de peptides macrocycliques ayant de 28 à 37 résidus d'acides aminés dont six cystéines, cationiques et hydrophobes. Deux familles, *Violaceae* et *Spermacoceae*, produisent la majeure partie de ces cyclotides. Plusieurs membres sont rapportés incluant la circuline A et B de *Chassalia parvifolia* (Gustafson et al., 1994), kalata B1 d'*Oldenlandia affinis* DC (Gran, 1973), et cyclopsychotride A de *Psychotria*

longipes (Witherup et al., 1994). Les trois ponts disulfure sont interconnectés en C1-C4, C2-C5 et C3-C6, à qui s'ajoutent des liaisons amides covalentes formées entre les deux extrémités N- et C-terminales, rendant la structure compacte et rigide. De plus, on retrouve chez cette famille le motif cystine-knot. Cette structure cyclique inusuelle rend ces peptides plus résistants aux protéases. Plusieurs activités biologiques sont rapportées pour ces polypeptides incluant l'inhibition des bactéries, des champignons, des virus (tel que le VIH), de la fixation des neurotensines (Witherup et al., 1994) et des effets uterotonus (Saether et al., 1995) et insecticides. Le cyclotide kalata1B possède à la fois une activité antimicrobienne, et insecticide sur les larves du lépidoptère *Helicoverpa punctigera* (Jennings et al., 2001).

6.7. Les LTPs

Leur découverte remonte à 1975 lors de travaux sur le trafic intracellulaire de lipides (Kader, 1975). Les Lipid Transfer Proteins (LTP) sont des protéines impliquées dans le transfert non-spécifique de molécules hydrophobes. Les LTPs forment une famille multigénique chez les plantes supérieures (plus de 40 gènes chez *A. thaliana*). Les LTP sont transcris sous forme de préprotéine avec un peptide signal. Deux familles de protéines sont différencierées sur la base de leur masse moléculaire et de leur structure tridimensionnelle, les LTP1 et les LTP2. Les LTP1 ont une masse moléculaire de 9 kDa et les LTP2 de 7 kDa. Les LTP1 sont des protéines généralement basiques et constituées de 91 à 95 acides aminés. Les LTP1 sont synthétisées sous la forme d'une préprotéine contenant un peptide signal de 20 à 25 acides aminés, ce qui suggère que ces protéines soient sécrétées (Tchang et al., 1985; Dieryck et al., 1992). Malgré une grande différence de structure primaire, les LTP1 ont une structure tertiaire commune déterminée par RMN (Simorre et al., 1991 ; Gincel et al., 1994 ; Petit et al., 1994 ; Heinemann et al., 1996 ; Poznanski et al., 1999) et par cristallographie (Shin et al., 1995 ; Lee et al., 1998 ; Charvolin et al., 1999) sur les LTP1 de blé, d'orge, de maïs, et de riz. Les LTP1 comprennent 8 cystéines très conservées formant quatre ponts disulfures connectés en C1-C6, C2-C3, C4-C7 et C5-C8. Ces ponts stabilisent une structure à 4 hélices α et un côté C-terminal flexible. Ces protéines possèdent un large tunnel hydrophobe dont les proportions varient suivant les LTPs, ce qui leur confère des propriétés de fixation et de transfert de lipides différentes (Lee et al., 1998).

La famille des LTP2 est beaucoup moins étudiée que celle des LTP1. De ce fait, moins de séquences sont disponibles dans les bases de données. Cependant, des données sur leur structure commencent à émerger. Si les 8 cystéines et la majorité des résidus hydrophobes

sont bien conservés entre les LTP1 et les LTP2, la connectivité des ponts disulfures diffère. La LTP2 du riz présente les ponts C1-C5, C2-C3, C4-C7 et C6-C8 et ne comporte que trois hélices α dont les deux premières sont bien alignées avec celles des LTP1 (Douliez *et al.*, 2001b ; Liu *et al.*, 2002). Bien que la fonction biologique des LTP soit encore sujet de discussions, les deux types de LTP sont considérés comme peptides de défense des plantes de par leur expression induite par des stress tant biotiques qu'abiotiques (Trevino et OConnell, 1998 ; Gomes *et al.*, 2003 ; Yubero-Serrano *et al.*, 2003), et par l'activité antibactérienne et antifongique de nombre d'entre elles (Broekaert *et al.*, 1997 ; Garcia Olmedo *et al.*, 1995; Kader, 1996). Le mécanisme par lequel les LTPs inhibent cette croissance n'est pas connu pour le moment.

6.8. Les autres membres

Au cours des dernières décennies, de nouveaux peptides antimicrobiens, n'appartenant à aucune des classes précédemment décrites, sont rapportés. A partir du maïs, Duvick et ses collaborateurs (1992) ont rapporté la présence d'un nouveau peptide, MBP-1, actif sur plusieurs champignons et bactéries phyto-pathogènes. MBP-1 est cationique, riche en résidus arginine et est composé de 33 acides aminés dont 4 cystéines. Deux autres peptides riches en glycine et histidine sont identifiés chez *Capsella bursa-pastoris*, Shepherine I et II (Park *et al.*, 2000). Ces peptides, de 28 et 38 acides aminés respectivement, résultent de la maturation d'un polypeptide Shep-GRP de 120 acides aminés. Ces shepherines sont actives sur plusieurs bactéries Gram+, Gram-, et champignons. Les Ib-AMP 1, 2 et 3 sont des peptides courts de 20 acides aminés dont 4 résidus cystéines, produits par *Impatiens balsamina* (Tailor *et al.*, 1997). Ces peptides forment probablement une nouvelle famille de peptides cationiques, les Impatiens, active contre plusieurs champignons filamenteux et bactéries Gram+ et Gram-. A partir des amandes de macadamia, un nouveau peptide antimicrobien MiAMP1, a été purifié et cloné (Marcus *et al.*, 1997). MiAMP1 est un peptide cationique de 76 acides aminés, qui possède une activité antimicrobienne contre plusieurs champignons et bactéries Gram+. La structure tridimensionnelle de ce peptide a été résolue par RMN, révélant une structure sous forme de « beta-barrel » atypique des peptides antimicrobiens (McManus *et al.*, 1999). Exprimé chez la plante canola, MiAMP1 lui confère une résistance au phyto-pathogène *Leptosphaeria maculans* (Kazan *et al.* 2002). Une autre famille de peptides antimicrobiens est isolée aussi de *Macadamia integrifolia*, MiAMP2. Cette nouvelle famille se compose de 4 peptides homologues (a-d) issus de la maturation d'une seule protéine précurseur (Marcus et

al., 1999). Néanmoins, cette famille présente une homologie avec des protéines de réserve : les vicilines.

7. Hypothèse et objectifs

L'état actuel des connaissances nous a permis d'émettre l'**hypothèse** suivante : une meilleure connaissance des peptides antimicrobiens d'origine végétale de même que la maîtrise de leurs mécanismes d'action permettraient d'ouvrir la voie à des études fondamentales sur la relation structure/fonction de ces composés, de détecter de nouvelles molécules à large spectre d'activité et/ou à haut pouvoir antimicrobien et de proposer de nouvelles utilisations dans les domaines agroalimentaires et pharmaceutiques.

L'objectif général de ce travail de doctorat vise à étudier et à caractériser la relation structure/fonction chez les peptides antimicrobiens d'origine végétale en utilisant des approches différentes mais complémentaires en bioinformatiques, en physicochimie et en moléculaire. **Les objectifs spécifiques** sont les suivants:

- **Objectif 1 :** vise à développer un logiciel, baptisé **Scientific DataBase Maker** (SciDBMaker) permettant l'extraction, l'analyse et le triage de données sur les protéines à partir de la base de données Swiss-Prot. Ces données seront utilisées pour la construction de nouvelles bases de données plus spécialisées dont la base de données sur les peptides antimicrobiens d'origine végétale.
- **Objectif 2:** vise à développer une nouvelle base de données, PhytAMP, contenant des informations taxonomiques, microbiologiques et physico-chimiques, données importantes pour mieux cerner les peptides antimicrobiens des plantes. La compilation de ces informations dans une ressource centralisée devrait donc faciliter l'étude du potentiel de ces molécules peptidiques comme alternatives en réponse à l'augmentation de la résistance aux antibiotiques ou pour créer des plantes transgéniques plus résistantes aux agents pathogènes. Cette étude comparative de ces phyto-peptides antimicrobiens constitue une base de départ pour la recherche de nouvelles molécules antimicrobiennes extraites à partir des plantes.

- **Objectif 3 :** Vise à évaluer le potentiel antimicrobien de quelques plantes: *Oudneya africana* R. Br. (Brassicaceae), *Juniperus phoenicea* L. (Cupressaceae) et *Pistacia atlantica* Desf. (Anacardiaceae), trois espèces de plantes spontanées utilisées à des fins médicinales dans les zones arides de la Tunisie. L'activité antimicrobienne de ces peptides de même que leurs propriétés physico-chimiques ont été évaluées.

- **Objectif 4 :** A pour but l'extraction, la purification et la caractérisation physico-chimique et microbiologique de nouveaux peptides produits par des plantes ayant un large spectre antimicrobien contre les pathogènes d'origine alimentaire. Cette étude vise à caractériser un extrait d'*Oudneya africana* dont l'extrait brut a démontré un large spectre d'activité antibactérienne. Le mode d'action de cet extrait sera analysé ainsi que l'effet synergique possible de cet extrait en association avec les antibiotiques.

**Matériel
&
Méthodes**

1. Matériel biologiques

1.1. Choix et collection de la matière végétale

Toutes les espèces ont été récoltées dans différentes localités dans la région de Médenine (Tunisie) par l'institut des régions d'Aride de Médenine (IRAM). *Juniperus phoenicea* L. (Cupressaceae) a été récoltée en mai 2001, *Pistacia atlantica* Desf. (Anacardiaceae) a été récoltée en mai 2003 et *Oudneya africana* R.Br (Brassicaceae) a été récoltée en avril 2002. Ces espèces sont préservées dans la banque de semences de l'IRAM.

1.2. Microorganismes et conditions de culture

Les souches microbiennes utilisées dans cette étude sont : *Listeria ivanovii*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Erwinia chrysanthemi*, *Staphylococcus aerus*, *Enterococcus hirae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans*. Les souches sont mises en culture dans un bouillon tryptique de soja (TSB; Difco Laboratories, Sparks, MD) en présence de 0.6% d'extrait de levure (w/v) et incubées en aérobiose à 30°C.

2. Méthodes expérimentales

2.1. Préparation des extraits végétales

2.1.1. Préparation des extraits bruts

Trois protocoles d'extraction de protéine ont été utilisés. Toutes les étapes de purification ont été réalisées à 4°C. Pour chaque espèce, 10g de graines matures ont été séchées à l'air, broyées et soumises aux 3 protocoles d'extraction suivants:

a. Protocole 1

Le premier protocole est décrit par Zhang et Lewis (1997). L'extraction des graines a été effectuée par l'acide sulfurique (0.05 M) pendant 3 h. Ensuite, l'extrait a été neutralisé avec de l'NaOH. La matière insoluble est filtrée (22 µm) et soumise à une centrifugation à 9 000 x g pendant 10min. L'extrait brut obtenu (P1) est testé pour détecter la présence d'une activité antibactérienne.

b. Protocole 2

Les semences sont homogénéisées dans une solution tampon d'acétate de sodium de 50 mM (pH 4.8) et incubées pendant une nuit à 4°C (Fujimura et al., 2003). L'homogénat est filtré et centrifugé à 9.000 x g pendant 20 minutes. Le surnageant obtenu (P2) est concentré et son activité antimicrobienne évaluée.

c. Protocole 3

Dans le troisième protocole (Song et al., 2004), les semences sont homogénéisées dans une solution de tampon phosphate (0.02 M) pH 7.2 contenant 0.1 M d'NaCl et incubées durant une nuit à 4°C. L'extrait est filtré et le pH du filtrat est ajusté à 4.0 avec de l'acide acétique 50% (v/v). Après incubation douce pendant 4h, le mélange est centrifugé à 9 000 x g pendant 40 minutes (P3) avant d'être testé pour son activité antimicrobienne.

2.1.2. Extraction acétonique des peptides actifs

Les trois extraits P1, P2 et P3 sont soumis à une précipitation par l'acétone pure (St. Louis, MO, USA) (v/v). Les fractions solubles (Surnageant) et celles précipitées (Culot) de ces extraits sont conservées à 4°C et leur activité antibactérienne est testée sur les souches pathogènes utilisées. L'extrait acétonique d'*Oudneya africana* a été fractionné en utilisant un filtre de 3kDa (Vivaspin 20 concentrator, Sartorius, France) à 8000 x g. Les fractions résultantes sont récupérées, et celle de taille <3kDa appelée fraction AS-3000.

2.1.3. Extraction méthanolique des peptides actifs

Idem que le paragraphe précédent en remplaçant l'acétone par le méthanol pure (St. Louis, MO, USA).

2.2. Dosage des protéines

Les protéines sont dosées à l'aide du kit RC DC Protein Assay (Bio-Rad®) dont la méthode est basée sur celle de Bradford (1976). Ce kit a été choisi pour sa compatibilité avec les détergents et les agents réducteurs contenus dans le tampon de lyse. Une gamme étalon, à partir d'une protéine standard (BSA) solubilisée dans le tampon de lyse, est préparée à des concentrations allant de 0 à 0,8 mg/ml (incrément de 0,2 mg/ml). Cinq microlitres des différentes solutions de BSA préparées sont diluées individuellement dans 20 µl d'eau bidistillée stérile, puis les réactifs du kit sont ajoutés selon les instructions du fabricant. Après 5 min d'incubation, l'absorbance est mesurée à 595 nm à l'aide d'un

spectrophotomètre. Nos échantillons biologiques sont dosés selon les mêmes modalités à partir d'un aliquot de 5 µL.

2.3. Tests d'activité antimicrobienne

2.3.1. Méthode de diffusion sur agar

La méthode de diffusion sur agar utilisée est celle décrite par (Tagg, 1976). Le bouillon tryptique de soja (TSB) contenant 0.6% d'extrait de levure (Difco Laboratories, Sparks, MD) est inoculé avec la souche bactérienne à 1% (v/v) et solidifié dans des boîtes de Pétri stérile (25 mL /boîte). Après perforations de trous à l'aide de pipette pasteur, on ajoute 80µL de l'extrait de plantes dans chaque trou. L'incubation est effectuée pendant 24h à 30°C.

2.3.2. Concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est déterminée par dosage sur microplaques de polystyrène (96 trous Microtest, Becton Dickinson Labware). Ainsi chaque trou contient une dilution de l'extrait à tester dans 250 µL de milieu de culture TSB. Ce dernier est ensuite inoculé avec 50 µL de la culture bactérienne diluée à une concentration d'environ 10^6 CFU/mL. Les plaques ont été incubées en aérobiose à 30°C pendant 24h. La densité optique ($DO_{650\text{nm}}$) est mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaques thermo-max (Molecular Devices, Sunnyvale CA). La CMI est calculée à partir de la dilution la plus élevée montrant une inhibition complète de la souche testée.

2.3.3. Suivi de la croissance microbienne en fonction du temps

Des dilutions croissantes de l'extrait de plante sont ajoutées dans les trous de la microplate contenant le milieu TSB préalablement inoculé avec 1% de la souche bactérienne (v/v) et incubés à 30°C pendant 24h. La densité optique est mesurée chaque heure à 650 nm.

2.3.4. Mode d'action de l'extrait actif sur les bactéries sensibles

Afin d'étudier le mode d'action de l'extrait actif, la souche indicatrice est mise en culture à 30°C pendant 14–16h dans le bouillon TSB. Les cellules bactériennes sont ensuite lavées et re-suspendues dans un tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 7.0). Un volume de 125 µL de la suspension bactérienne est placé dans les trous de la microplaquette. À cette suspension bactérienne, des concentrations croissantes de l'extrait actif (125 µL) sont ajoutées. Les différents échantillons sont ensuite incubés à 30°C pendant 6h. Enfin, l'absorbance est mesurée à 650 nm avec un lecteur de microplaquette Thermomax (Molecular Devices, Opti-

Ressources, Charny, QC, Canada). Le pourcentage lyse cellulaire est calculé en utilisant la formule suivante:

$$\% = 100 - (A_t/A_0 \times 100),$$

où A_0 et A_t sont les absorbances mesurées à 0, 6 ou à 18h d'incubation, respectivement.

2.3.5. Effet des cations divalents sur l'extrait d'*Oudneya africana*

Des cultures cellulaires de *L.ivanovii* et *E.coli* sont centrifugées et lavées 3x avec un tampon d'acide morpholine éthane sulfonique (MES) (50 mmol, pH 6.5). Les cellules sont ensuite re-suspendues dans 0.1% (1 ml) du même tampon contenant les cations divalent (10 mmol de CaCl₂, MgSO₄ ou MnSO₄), ou les cations divalents (10 mmol) en présence de 20 mmol d'un agent chélateur EDTA (acide éthylènediamine tétraacétique). L'extrait actif est ensuite ajouté et les cellules sont incubées à 30°C pendant 30 min. après incubation, des séries de dilutions des cellules sont préparées avec l'eau peptonée (0.1%, w/v) et incubées dans le bouillon TSB à 30°C pendant 18 h.

2.3.6. Evaluation de l'effet synergique des antibiotiques avec l'extrait de plante *O. africana*

La combinaison d'antimicrobiens est considérée comme synergique si l'effet de combinaison est plus important que l'effet de l'agent seul ou supérieur à la somme des effets des agents antimicrobiens. Cette évaluation a été effectuée selon la méthode de [Muroi et Kubo \(1996\)](#). Les antibiotiques utilisés sont les suivants: ampicilline, chloramphénicol, érythromycine, gentamicine, pénicilline G, streptomycine, tétracycline et vancomycine. Des aliquot de 100 µl des cultures bactériennes (10⁶ cellules/mL) sont inoculés dans le milieu TSB en présence d'antibiotiques avec différentes concentrations d'extraits plante. Pour évaluer l'effet des combinaisons, un indice 'fractional inhibitory concentration (FIC)' est calculé comme suit ([Mackay et al. 2000](#)): FIC index = FIC_{Antibiotique} + FIC_{AS-3000} = (CMI de l'antibiotique en combinaison/CMI de l'antibiotique seul) + (CMI de l'extrait AS-3000 en combinaison/CMI de l'extrait AS-3000 seul). L'interprétation de l'effet est effectuée comme suit: synergique (FIC index ≤0.5), additif (0.5 < FIC index ≤1), indifférent (1 < FIC index ≤2) and antagoniste (FIC index > 2).

2.3.7. Détermination de l'effet post-antibiotique

Les souches bactériennes sont incubées dans le milieu TSB pendant 12 h à 30°C (OD600 = 0.1). Ensuite, l'équivalent de 10⁶ CFU/mL de cette suspension est incubé pendant 30 min à 30°C sans ou avec l'ampicilline (1 × CMI), l'extrait AS-3000 (0.1 × CMI), et la

combinaison des deux. La suspension bactérienne est, par la suite, diluée 1000x pour éliminer l'antibiotique et l'extrait AS-3000, et mise en culture à 30°C. La croissance bactérienne est déterminée au cours du temps et exprimée CFU/mL. L'effet post-antibiotique (PAE) est défini selon [Craig et Gudmundsson \(1996\)](#) comme suit : $PAE = T - C$, où T est le temps requis par les cellules bactériennes pour augmenter leur nombre par un facteur de log10 par rapport au temps initial, et C correspond au temps requis par les cellules control.

2.4. Microscopie électronique à balayage (MEB)

Des cellules de chaque agent pathogène ont été examinées par microscopie électronique à balayage (MEB) pour visualiser tout changement morphologique qui a eu lieu dans la cellule suite à une exposition à l'extrait de plante AS-3000. Ces observations ont été menées sur les cellules après 16 heures d'incubation des souches bactériennes. La suspension a été divisée en deux parties et l'extrait AS-3000 a été ajouté à une partie de manière à atteindre une concentration de 2 mg/mL, l'autre a servi comme contrôle négatif. Après centrifugation des cellules bactériennes, plusieurs étapes de fixation et déshydratation sont nécessaires :

- 1- Fixation au glutaraldéhyde 2.5%, paraformaldéhyde 4% dans un tampon cacodylate de sodium 0.1M pH 7.3, 24 heures ou plus.
- 2- Rincage au tampon cacodylate, 3 x 10 min.
- 3- Post-fixation au tétroxide d'osmium 1% dans tampon cacodylate, 90 min.
- 4- Rincage au tampon cacodylate, 3 x 10 min.
- 5- Déshydratation à l'alcool (50, 70, 95, 100%), 10 min à chaque concentration.
- 6- Trempage dans l'alcool 100%, 1 x 40 min, 1 x 10 min.
- 7- Trempage dans l'hexaméthyldisilazane, 2 x 30 min.
- 8- Séchage à l'air, ON.
- 9- Dorure des spécimens.
- 10- Observation au microscope électronique à balayage JEOL 6360LV (Tokyo, Japon).

A chaque étape, il est nécessaire de centrifuger les bactéries pour les recueillir pour l'étape suivante.

2.5. Traitements thermiques, protéases et stabilité dans les solvants organiques

Les extraits ont été soumis tour à tour aux peptidases suivantes (St. Louis, MO, USA): α -trypsine (10 000 U/mg), α -chymotrypsine (42 U/mg), pronase E (10 U/mg), proteinase K (8 U/mg), et subtilisine A (8 U/mg). Chaque échantillon est incubé en présence d'une peptidase à une concentration finale de 1 mg/ml pendant 2 h à 37°C, les échantillons contenant l' α -

trypsine et l' α -chymotrypsine sont incubés à 25°C. Les enzymes sont ensuite inactivées par ébullition pendant 3 minutes, et l'activité résiduelle des échantillons est déterminée par la méthode de dilution critique CMI.

2.6. Analyses statistiques

Les résultats sont analysés par le test ANOVA inclus dans le programme SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC). Un test de comparaison multiple (LSD) est utilisé pour évaluer les différences significatives entre les traitements ($P<0.05$).

Résultats & Discussions

Chapitre 1

Création d'un outil de conception des bases de données protéiques : SciDBMaker

BMC Bioinformatics, 2008, 7:89 (facteur d'impact 3.49) Highly accessed

Présentation

La recherche en biologie moléculaire a connu une croissance exponentielle ces dernières décennies. Pour stocker les résultats de ces travaux, plusieurs bases de données ont été développées. Une variété de bases de données des séquences protéiques existent. Bien que toutes ces ressources essayent de fournir un maximum d'informations, les utilisateurs sont souvent contraints de rechercher les informations dans plusieurs ressources à la fois. Les bases de données universelles couvrent un large éventail de domaines et ont tendance à offrir des informations moins détaillées que les petites ressources spécialisées. Ceci crée souvent une nécessité de combiner les données provenant de nombreuses sources afin d'obtenir une image complète de l'information désirée. Les chercheurs scientifiques développent de plus en plus de nouvelles bases de données spécifiques pour améliorer leur compréhension des processus biologiques.

Dans cet article, nous présentons l'implémentation d'un nouvel outil pour l'analyse des séquences protéiques. Ayant une interface utilisateur facile à manipuler, ce logiciel offre la possibilité de créer des bases de données protéiques plus spécialisées à partir des bases de données universelles telles que Swiss-Prot. Une famille de protéines connues sous le nom de bactériocines est analysée comme ‘exemple du concept’.

SciDBMaker est un logiciel autonome qui permet l'extraction des données des protéines à partir de la base de données Swiss-Prot, l'analyse des séquences comprenant le calcul du profil physico-chimique, la recherche des séquences homologues, l'alignement multiple des séquences et la construction de nouvelles bases de données plus spécialisées. Il rassemble les informations avec une relative facilité, les met à jour et compare diverses données pertinentes d'une famille de protéines donnée, ce qui permettrait de résoudre le problème de la dispersion des résultats de recherche biologique.

L'ensemble des résultats de cette première étude est développé dans la publication : «**SciDBMaker : software for computer aided design of specialized biological databases**».

(*BMC Bioinformatics*, 2008 25 Fév., 7:89)

Software

Open Access

SciDBMaker: new software for computer-aided design of specialized biological databases

Riad Hammami¹, Abdelmajid Zouhir¹, Karim Naghmouchi², Jeannette Ben Hamida¹ and Ismail Fliss^{*3}

Address: ¹Unité de Protéomie Fonctionnelle & Biopréservation Alimentaire, Institut Supérieur des Sciences Biologiques Appliquées de Tunis, Université El Manar, Tunisie, ²Agriculture and Agri-Food Canada, Lethbridge Research Centre, Lethbridge, Alberta, T1J 4B1 Canada and ³Institut des Nutraceutiques et des Aliments Fonctionnels (INAF), Université Laval, Québec, Canada

Email: Riadh Hammami - Riadh.hammami@fst.rnu.tn; Abdelmajid Zouhir - azouheirb10@yahoo.fr; Karim Naghmouchi - naghmouchik@agr.gc.ca; Jeannette Ben Hamida - benhamida_jeannette@yahoo.fr; Ismail Fliss* - ismail.fliss@aln.ulaval.ca

* Corresponding author

Published: 25 February 2008

Received: 6 December 2007

BMC Bioinformatics 2008, 9:121 doi:10.1186/1471-2105-9-121

Accepted: 25 February 2008

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/9/121>

© 2008 Hammami et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: The exponential growth of research in molecular biology has brought concomitant proliferation of databases for stocking its findings. A variety of protein sequence databases exist. While all of these strive for completeness, the range of user interests is often beyond their scope. Large databases covering a broad range of domains tend to offer less detailed information than smaller, more specialized resources, often creating a need to combine data from many sources in order to obtain a complete picture. Scientific researchers are continually developing new specific databases to enhance their understanding of biological processes.

Description: In this article, we present the implementation of a new tool for protein data analysis. With its easy-to-use user interface, this software provides the opportunity to build more specialized protein databases from a universal protein sequence database such as Swiss-Prot. A family of proteins known as bacteriocins is analyzed as 'proof of concept'.

Conclusion: SciDBMaker is stand-alone software that allows the extraction of protein data from the Swiss-Prot database, sequence analysis comprising physicochemical profile calculations, homologous sequences search, multiple sequence alignments and the building of new and more specialized databases. It compiles information with relative ease, updates and compares various data relevant to a given protein family and could solve the problem of dispersed biological search results.

Background

The exponential growth of molecular biology research in recent decades has brought concomitant growth in the number and size of databases used to interpret experimental findings. For example, UniProtKB/Swiss-Prot

release 53.2, dated 26-06-07, contains 272,212 sequence entries comprising 99,940,143 amino acids, abstracted from 157,086 references [1]. A variety of protein sequence databases exist, ranging from simple sequence repositories to expertly curated universal databases that cover all

species and in which the original sequence data are enhanced by manual addition of further information in each sequence record [2]. While all of these strive for completeness, the range of user interests is often beyond their scope. This may reflect the user's wish to combine different types of information or the inability of a single resource to contain the complete details of every relevant experiment. In addition, large databases with broad domains tend to offer less detailed information than smaller, more specialized, resources, with the result that data from many resources may need to be combined to provide a complete picture. There is a clear need to gather, filter and critically evaluate this mass of information so that it can be used with greater efficiency. Since scientists are continually developing new specific databases to enhance their understanding of biological processes, we created SciDBMaker to provide a tool for easy building of new specialized protein knowledge bases. This paper describes the development of new stand-alone software, *Scientific DataBase Maker*, for protein data analysis with online and/or off-line access. The software interface allows successive steps for sequence manipulation, starting from user sequence search and homologous sequence retrieval from the SwissProt databank, followed by physicochemical profile calculations, multiple sequence alignments, phylogenetic tree visualization and culminating in database export/building. All steps are performed in an interactive manner. Physical and chemical parameters, rarely found in public databases, provide a helpful tool for the analysis of a set of proteins and their calculation is achieved in a direct and interactive manner, with off-line access. SciDBMaker also processes a great number of sequences simultaneously.

Implementation

Swiss-Prot format

The Swiss-Prot format has been described previously in reference [3].

Physicochemical profiles

Protein families may be analyzed with the help of physicochemical profiles such as amino acid composition (acidic, basic, hydrophobic, polar, absent and common amino acids), atomic composition, molecular weight [4], theoretical pI [4,5], extinction coefficient [6], absorbance at 280 nm, estimated half-life in mammalian cells, yeast and *E. coli* [7,8], instability index [9], aliphatic index [10], grand average of hydropathicity (GRAVY) [11] and protein-binding potential (Boman index) [12].

Integrated tools

The European Bioinformatics Institute provides the Dbfetch tool for easy retrieval of entries from various databases [13]. Entries may be imported online into SciDBMaker from the SwissProt database using Dbfetch. To find similar sequences, the containers can be queried with either proteins from the SwissProt database or user-imported sequences, using the BLAST algorithm [14]. Multiple sequence alignments (MSA) are an essential tool for predicting protein structure and function prediction, phylogenetic inference and other common tasks in sequence analysis. To date, CLUSTALW is still the most popular alignment tool. Since it is the method of choice for biologists, CLUSTALW [15] was included in SciDBMaker for multiple sequence alignments. Generated trees may be easily viewed using phylogenetic tree visualization software such as TREEVIEW [16].

Hardware and software specifications

The executable version of the SciDBMaker software can be installed and run on a standard PC platform with a Windows operating system. The software development was done using Windows XP and tested with success on all platforms, including Win 98, Win XP and Win vista. The source code was written in Microsoft Visual Basic .NET (2005). The environment is based upon the .NET Framework library v2.0.

Results & discussion

Program description

The workflow diagram shown in Figure 1 and the following discussion illustrate how the tool works. Figure 2 illustrates a typical user interface of the program. Users may open files in Fasta or Swiss-Prot format, or import sequence entries from the Swiss-Prot database. Users may also use their own sequences, search for homologous sequences entries in Swiss-Prot database using BLAST algorithm and load selected entries into SciDBMaker (Fig. 3). The program will automatically extract available information in Swiss-Prot entries and calculate physicochemical profiles for loaded proteins. Users may also choose the information to be extracted and the properties to be calculated, as shown in Figure 4. The interface allows users to filter, search, add, remove and update data rows as required. An intuitive interface allows BLAST selection of all user sequences. Similarly, sequences may be aligned using the multiple alignment program ClustalW. Resulting trees may be shown using the phylogenetic tree visualization software TREEVIEW, as proposed by SciDBMaker. As a final step, data may be printed or saved in various file formats. Sequences may be extracted into a Fasta format file. The resulting data grid may be saved as an MS Excel data sheet, as well as database files (XML, MS Access, MySQL).

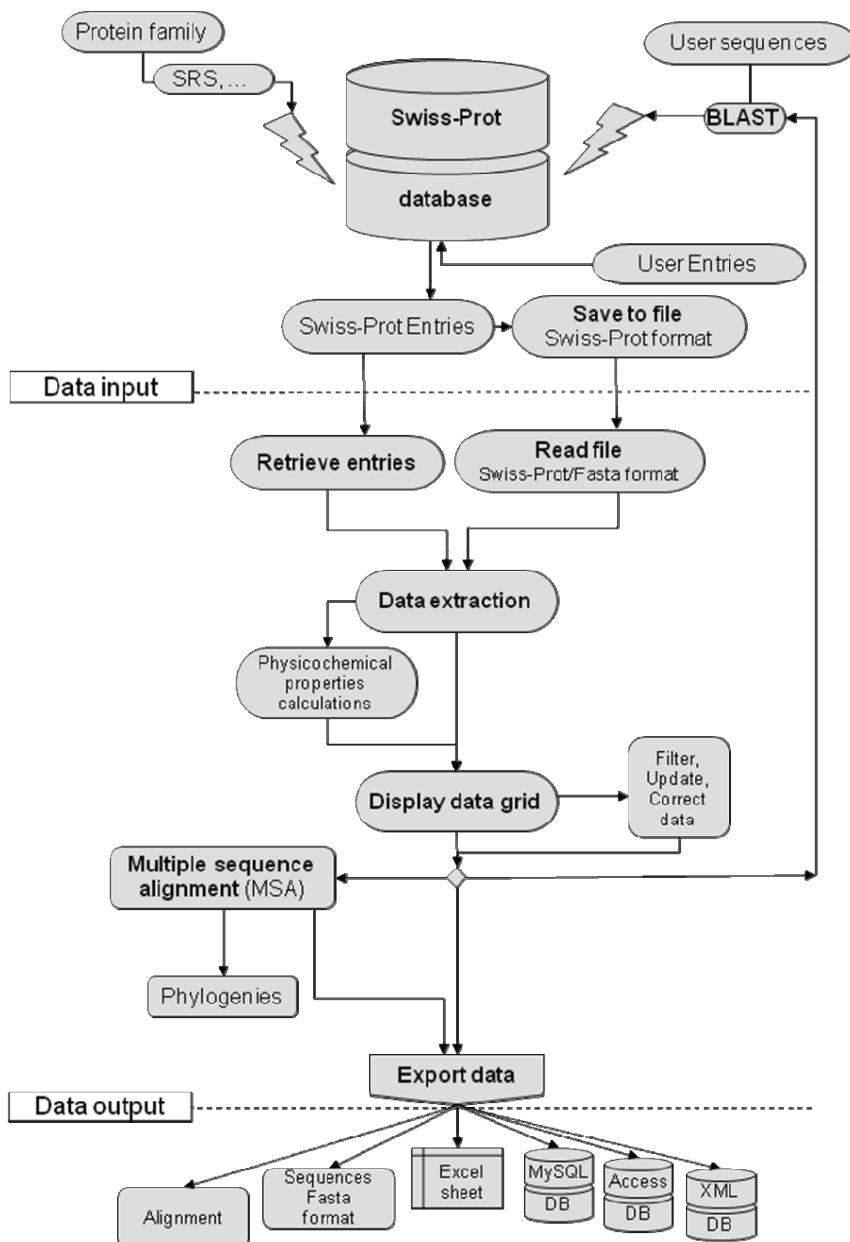


Figure 1
Workflow diagram.

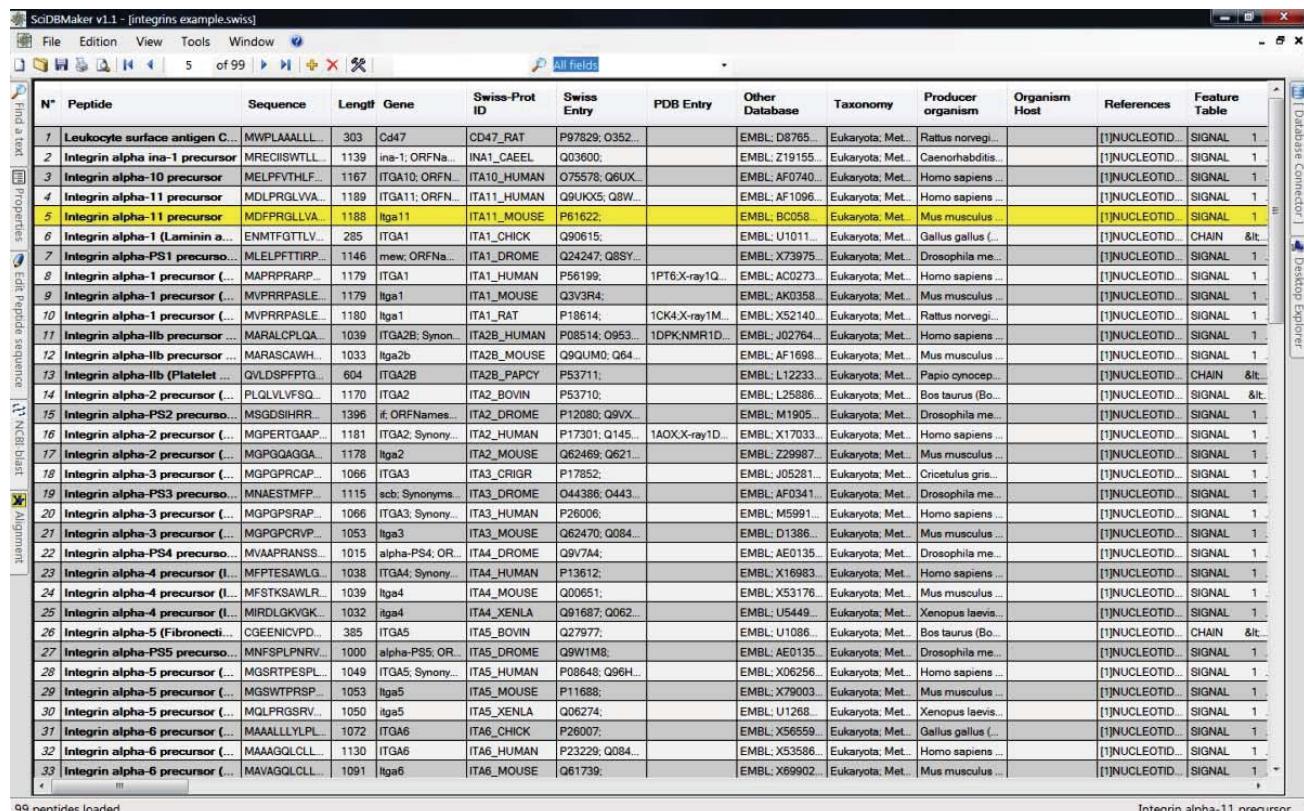
Program runs

A database was developed using SciDBMaker. Named BACTIBASE, this database has been previously described in reference [17].

Conclusion

The stand-alone software SciDBMaker allows the extraction of protein data from the Swiss-Prot database,

sequence analysis comprising physicochemical profile calculations, homologous sequence searches, multiple sequence alignments and the building of new and more specialized databases. Programs of this type compile information with relative ease, update and compare various data relevant to a given protein family and could solve the problem of dispersed biological search results. Collection of a multitude of information regarding a given pro-



The screenshot shows the SciDBMaker v1.1 application window. The main area displays a table of peptide data with the following columns: N°, Peptide, Sequence, Length, Gene, Swiss-Prot ID, Swiss Entry, PDB Entry, Other Database, Taxonomy, Producer organism, Organism Host, References, and Feature Table. The table contains 99 rows of data, with the last row being highlighted in yellow. The 'References' column for this row shows 'Integrin alpha-11 precursor'. The bottom right corner of the table has a note: '99 peptides loaded' and 'Integrin alpha-11 precursor'.

N°	Peptide	Sequence	Length	Gene	Swiss-Prot ID	Swiss Entry	PDB Entry	Other Database	Taxonomy	Producer organism	Organism Host	References	Feature Table
1	Leukocyte surface antigen C...	MWPLAAALLL...	303	Cd47	CD47_RAT	P97820; Q352...		EMBL; D8785...	Eukaryota; Met...	Rattus norvegi...		[1]NUCLEOTID...	SIGNAL 1
2	Integrin alpha ins-1 precursor	MRCIIISWTL...	1139	ina-1; ORFNa...	INA1_CAEEL	Q03600...		EMBL; Z19155...	Eukaryota; Met...	Caenorhabditis...		[1]NUCLEOTID...	SIGNAL 1
3	Integrin alpha-10 precursor	MELPFVTHLF...	1167	ITGA10; ORFN...	ITA10_HUMAN	Q75578; Q6UX...		EMBL; AF0740...	Eukaryota; Met...	Homo sapiens ...		[1]NUCLEOTID...	SIGNAL 1
4	Integrin alpha-11 precursor	MDLPRGLVVA...	1189	ITGA11; ORFN...	ITA11_HUMAN	Q9UOK5; Q8W...		EMBL; AF1096...	Eukaryota; Met...	Homo sapiens ...		[1]NUCLEOTID...	SIGNAL 1
5	Integrin alpha-11 precursor	MDDFPRGLLLVA...	1188	Itga11	ITA11_MOUSE	P61622...		EMBL; BC058...	Eukaryota; Met...	Mus musculus ...		[1]NUCLEOTID...	SIGNAL 1
6	Integrin alpha-1 (Laminin a...	ENMNTFQITLV...	285	ITGA1	ITA1_CHICK	Q90615...		EMBL; U1011...	Eukaryota; Met...	Gallus gallus ...		[1]NUCLEOTID...	CHAIN <
7	Integrin alpha-PS1 precursor	MLELPFTTIRP...	1146	mew; ORFNa...	ITA1_DROME	Q24470; Q8SY...		EMBL; X73975...	Eukaryota; Met...	Drosophila me...		[1]NUCLEOTID...	SIGNAL 1
8	Integrin alpha-1 precursor (...)	MAPRPRPARP...	1179	ITGA1	ITA1_HUMAN	P56199...	1P76X-ray1Q...	EMBL; AC0273...	Eukaryota; Met...	Homo sapiens ...		[1]NUCLEOTID...	SIGNAL 1
9	Integrin alpha-1 precursor (...)	MVPPRPPASLE...	1179	Itga1	ITA1_MOUSE	Q3V3R4...		EMBL; AK0358...	Eukaryota; Met...	Mus musculus ...		[1]NUCLEOTID...	SIGNAL 1
10	Integrin alpha-1 precursor (...)	MVPPRPPASLE...	1180	Itga1	ITA1_RAT	P18614...	1CK4X-ray1M...	EMBL; X52140...	Eukaryota; Met...	Rattus norvegi...		[1]NUCLEOTID...	SIGNAL 1
11	Integrin alpha-1b precursor	... MARALCPLQAA...	1039	ITGA2B; Synon...	ITA2B_HUMAN	P08514; Q953...	1DPK;NMR1D...	EMBL; J02764...	Eukaryota; Met...	Homo sapiens ...		[1]NUCLEOTID...	SIGNAL 1
12	Integrin alpha-1b precursor	... MARASCAWH...	1033	Itga2b	ITA2B_MOUSE	Q9QUM0; Q64...		EMBL; AF1698...	Eukaryota; Met...	Mus musculus ...		[1]NUCLEOTID...	SIGNAL 1
13	Integrin alpha-1b (Platelet ...)	QVLDSPFFPTG...	604	ITGA2B	ITA2B_PAPCY	P53711...		EMBL; L12233...	Eukaryota; Met...	Papio cynocep...		[1]NUCLEOTID...	CHAIN <
14	Integrin alpha-2 precursor	PLQLVLVFSQL...	1170	ITGA2	ITA2_BOVIN	P53710...		EMBL; L25886...	Eukaryota; Met...	Bos taurus (Bo...		[1]NUCLEOTID...	SIGNAL <
15	Integrin alpha-PS2 precursor	MSGDSIHSRR...	1396	#; ORFNames...	ITA2_DROME	P12080; Q9VX...		EMBL; M1905...	Eukaryota; Met...	Drosophila me...		[1]NUCLEOTID...	SIGNAL 1
16	Integrin alpha-2 precursor	MOPERTGAAP...	1181	ITGA2; Synony...	ITA2_HUMAN	P17301; Q145...	1AOX;X-ray1D...	EMBL; X17033...	Eukaryota; Met...	Homo sapiens ...		[1]NUCLEOTID...	SIGNAL 1
17	Integrin alpha-2 precursor	MQPQQAGGA...	1178	Itga2	ITA2_MOUSE	Q62469; Q621...		EMBL; Z29987...	Eukaryota; Met...	Mus musculus ...		[1]NUCLEOTID...	SIGNAL 1
18	Integrin alpha-3 precursor	MQGPGRCPA...	1066	ITGA3	ITA3_CRIGR	P17852...		EMBL; J05281...	Eukaryota; Met...	Crictetus gris...		[1]NUCLEOTID...	SIGNAL 1
19	Integrin alpha-PS3 precursor	MNAESTMF...	1115	acb; Synonyms...	ITA3_DROME	P04386; Q443...		EMBL; AF0341...	Eukaryota; Met...	Drosophila me...		[1]NUCLEOTID...	SIGNAL 1
20	Integrin alpha-3 precursor	MQGPGRCPA...	1066	ITGA3; Synony...	ITA3_HUMAN	P26006...		EMBL; M5991...	Eukaryota; Met...	Homo sapiens ...		[1]NUCLEOTID...	SIGNAL 1
21	Integrin alpha-3 precursor	MQGPGRCPV...	1053	Itga3	ITA3_MOUSE	Q62470; Q084...		EMBL; D1386...	Eukaryota; Met...	Mus musculus ...		[1]NUCLEOTID...	SIGNAL 1
22	Integrin alpha-PS4 precursor	MVAAPRANSS...	1015	alpha-PS4; OR...	ITA4_DROME	Q9V74A...		EMBL; AE0135...	Eukaryota; Met...	Drosophila me...		[1]NUCLEOTID...	SIGNAL 1
23	Integrin alpha-4 precursor	(I...) MFPTESAWLG...	1038	ITGA4; Synony...	ITA4_HUMAN	P13612...		EMBL; X16983...	Eukaryota; Met...	Homo sapiens ...		[1]NUCLEOTID...	SIGNAL 1
24	Integrin alpha-4 precursor	(I...) MFSTKSAWLR...	1039	Itga4	ITA4_MOUSE	Q00651...		EMBL; X53176...	Eukaryota; Met...	Mus musculus ...		[1]NUCLEOTID...	SIGNAL 1
25	Integrin alpha-4 precursor	(I...) MIRDLGKVKG...	1032	Itga4	ITA4_XENLA	Q91687; Q062...		EMBL; U5449...	Eukaryota; Met...	Xenopus laevis...		[1]NUCLEOTID...	SIGNAL 1
26	Integrin alpha-5 (Fibronecti...	CGEEENICVPD...	385	ITGA5	ITA5_BOVIN	Q27977...		EMBL; U1086...	Eukaryota; Met...	Bos taurae (Bo...		[1]NUCLEOTID...	CHAIN <
27	Integrin alpha-PS5 precursor	MNFSPLPNVR...	1000	alpha-PS5; OR...	ITA5_DROME	Q9W1M8...		EMBL; AE0135...	Eukaryota; Met...	Drosophila me...		[1]NUCLEOTID...	SIGNAL 1
28	Integrin alpha-5 precursor	MGSRTTPESP...	1049	ITGA5; Synony...	ITA5_HUMAN	P08648; Q96H...		EMBL; X06256...	Eukaryota; Met...	Homo sapiens ...		[1]NUCLEOTID...	SIGNAL 1
29	Integrin alpha-5 precursor	MGSWTPRSP...	1053	Itga5	ITA5_MOUSE	P11688...		EMBL; X79003...	Eukaryota; Met...	Mus musculus ...		[1]NUCLEOTID...	SIGNAL 1
30	Integrin alpha-5 precursor	MQLPRGSRV...	1050	Itga5	ITA5_XENLA	Q06274...		EMBL; U1268...	Eukaryota; Met...	Xenopus laevis...		[1]NUCLEOTID...	SIGNAL 1
31	Integrin alpha-6 precursor	MAAALLYLPL...	1072	ITGA6	ITA6_CHICK	P26007...		EMBL; X56559...	Eukaryota; Met...	Gallus gallus ...		[1]NUCLEOTID...	SIGNAL 1
32	Integrin alpha-6 precursor	MAAAGQLCLL...	1130	ITGA6	ITA6_HUMAN	P23229; Q084...		EMBL; X53586...	Eukaryota; Met...	Homo sapiens ...		[1]NUCLEOTID...	SIGNAL 1
33	Integrin alpha-6 precursor	MAVAGQLCLL...	1091	Itga6	ITA6_MOUSE	Q61739...		EMBL; X69902...	Eukaryota; Met...	Mus musculus ...		[1]NUCLEOTID...	SIGNAL 1

Figure 2
User interface.

tein family allows the development of more coherent and focused approaches to structure-function relationships, thereby enhancing the development of theoretical concepts in biological sciences.

Availability and requirements

The program runs on the PC platform with a Windows operating system. The graphical environment needs the .NET Framework library v2.0. This complement is available for free download at the Microsoft website and comes pre-installed in the majority of recent computers. An installation package for SciDBMaker may be obtained from the authors free of charge upon request. The SciDBMaker website is hosted by the Centre de Calcul El Khawarizmi CCK (Tunisia) and is available at <http://scidbmaker.pfba-lab.org>. The SciDBMaker software is provided 'as is' with no guarantee or warranty of any kind and is available for all non-commercial use. Any other use of the software requires special permission from the primary author.

Authors' contributions

RH programmed the software interface, performed the implementation of physicochemical parameters and drafted the manuscript. AZ participated in the design of the study, interacted with RH to carry out the physico-chemical data calculation and tested the program. KN tested the program and contributed to the manuscript. JBH oversaw the project and helped define user requirements. IF conceived the study, participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

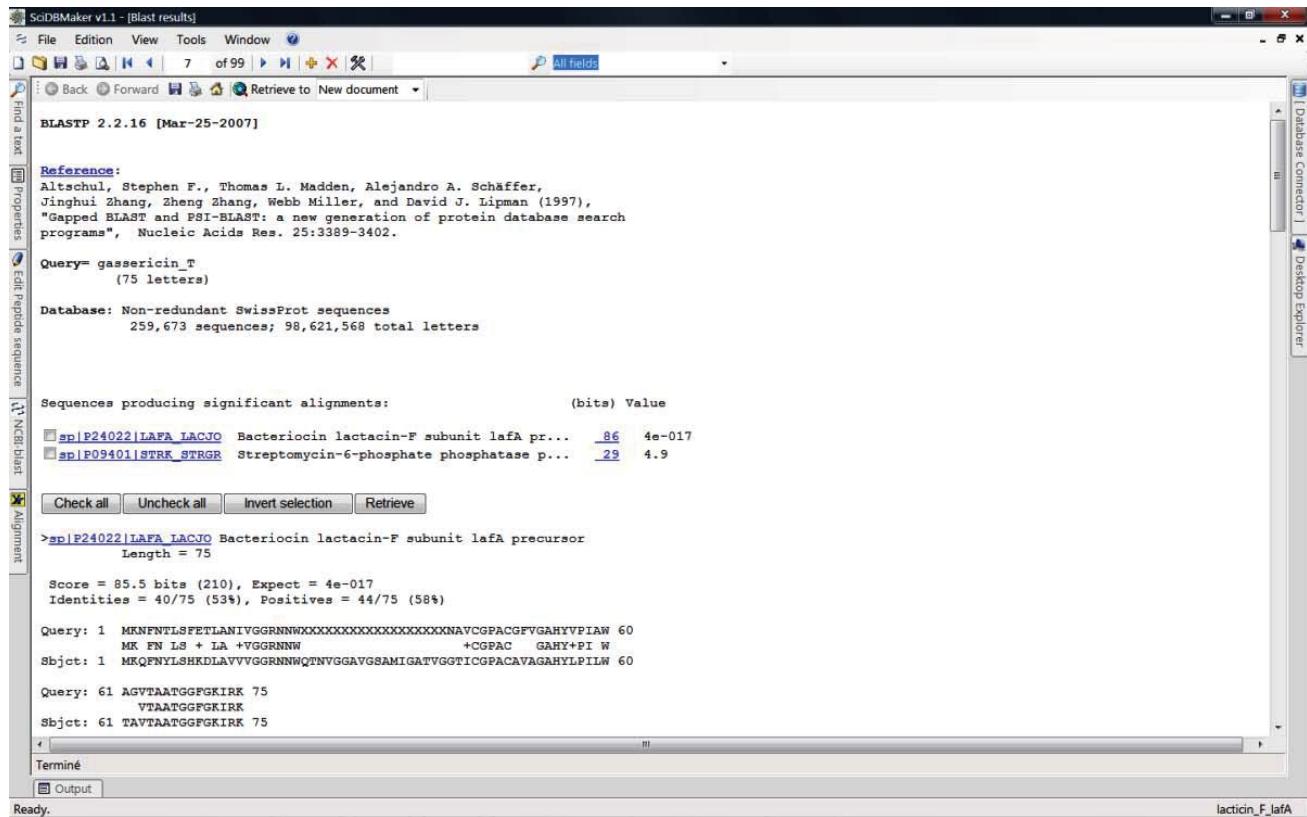


Figure 3
A typical Blast result window.

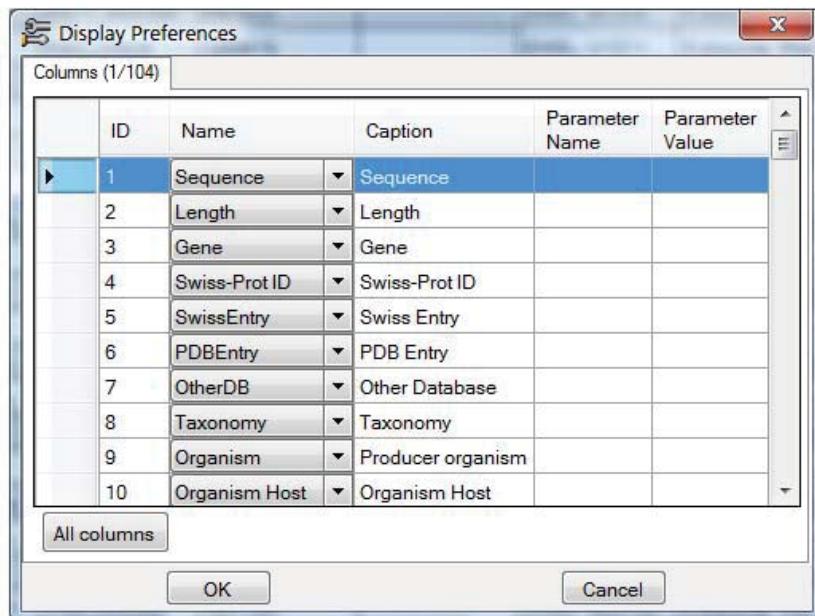


Figure 4
Preference display columns.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Stephen Davids for proofreading the manuscript.
This research was supported by Ministry of Higher Education, Scientific Research and Technology, Republic of Tunisia.

References

1. The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res* 2007, **35**:D193-D197.
2. Apweiler R, Bairoch A, Wu HC: **Protein sequence databases.** *Curr Opin Chem Biol* 2004, **8**:76-80.
3. Boeckmann B, Bairoch A, Apweiler R, Blatter MC, Estreicher A, Gasteiger E, Martin MJ, Michoud K, O'Donovan C, Phan I, Pilbaut S, Schneider M: **The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003.** *Nucleic Acids Res* 2003, **31**:365-370.
4. Patrickios CS, Yamasaki EN: **Polypeptide amino acid composition and isoelectric point.** *Anal Biochem* 1995, **231**:82-91.
5. Bjellqvist B, Basse B, Olsen E, Celis JE: **Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions.** *Electrophoresis* 1994, **15**:529-539.
6. Henryk M, Russell MC, Randolph VL: **Statistical determination of the average values of the extinction coefficients of tryptophan and tyrosine in native proteins.** *Anal Biochem* 1992, **200**:74-80.
7. Bachmair A, Finley D, Varshavsky A: **In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue.** *Science* 1986, **234**:179-186.
8. Gonda DK, Bachmair A, Wunning I, Tobias JW, Lane WS, Varshavsky AJ: **Universality and structure of the N-end rule.** *J Biol Chem* 1989, **264**:16700-16712.
9. Guruprasad K, Reddy BVB, Pandit MW: **Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence.** *Protein Eng* 1990, **4**:155-161.
10. Ikai AJ: **Thermostability and aliphatic index of globular proteins.** *J Biochem* 1980, **88**:1895-1898.
11. Jack K, Russell FD: **A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein.** *J Mol Biol* 1982, **157**:105-132.
12. Radzeka A, Wolfenden R: **Comparing the polarities of amino acids: side-chain distribution coefficients between vapor phase, cyclohexane, 1-octanol and neutral aqueous solution.** *Biochemistry* 1988, **27**:1664-1670.
13. Labarga A, Valentin F, Andersson M, Lopez R: **Web Services at the European Bioinformatics Institute.** *Nucleic Acids Res* 2007:W6-11.
14. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ: **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.** *Nucleic Acids Res* 1997, **25**:3389-3402.
15. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG: **ClustalW and ClustalX version 2.0.** *Bioinformatics* 2007, **23(21)**:2947-2948.
16. Page RDM: **TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers.** *CABIOS* 1996, **12**:357-358.
17. Hammami R, Zouhir A, Ben Hamida J, Fliss I: **BACTIBASE: a new web-accessible database for bacteriocin characterization.** *BMC Microbiol* 2007, **7**:89.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



Chapitre 2

PhytAMP: une base de données dédiée aux peptides antimicrobiens de plantes

Nucleic acids research, 4 oct. 2008, database issue (facteur d'impact 6.95)

Présentation

Les plantes produisent des peptides antimicrobiens riches en cystéine comme une défense naturelle contre les agents pathogènes. En se basant sur l'homologie de séquences, la plupart de ces peptides ont été classés en différentes familles tel que les α -défensines, les thionines, les protéines de transfert de lipides (LTPs), les cyclopeptides, les snakines et les Hevein-like. Bien que de nombreux peptides antimicrobiens de plantes soient maintenant bien caractérisés, beaucoup d'informations manquent encore ou ne sont pas disponibles pour les utilisateurs potentiels. La compilation de ces informations dans une ressource centralisée comme une base de données devrait donc faciliter l'étude du potentiel de ces molécules peptidiques comme alternatives en réponse à l'augmentation de la résistance aux antibiotiques ou pour augmenter la résistance des plantes aux agents pathogènes par génie génétique.

Pour atteindre cet objectif, nous avons développé une nouvelle base de données, PhytAMP, qui contient des informations importantes sur les peptides antimicrobiens des plantes, comprenant des données taxonomiques, microbiologiques et physico-chimiques. La version actuelle de PhytAMP comprend 271 molécules issues de diverses familles incluant les Amaranthaceae (9), les Andropogoneae (10), les Brassicaceae (36), les Oryzeae (11), les Santalaceae (11), les Spermacoceae (17), les Triticeae (34), les Vicieae (12), et les Violaceae (51). L'information est très facile à extraire de cette base de données, ce qui permet la prédiction des relations structure / fonction et les organismes cibles. Ceci permettra une meilleure exploitation des activités biologiques de ces peptides à la fois dans l'industrie pharmaceutique et dans le secteur agricole. PhytAMP est accessible gratuitement à <http://phytamp.pfba-lab.org>.

L'ensemble des résultats de cette deuxième étude est développé dans l'article: «**PhytAMP : a database dedicated to antimicrobial plant peptides**».

(*Nucleic acids research*, database issue 2009, 37: D963-D968).

PhytAMP: a database dedicated to antimicrobial plant peptides

Riad Hammami^{1,2,3}, Jeannette Ben Hamida¹, Gérard Vergoten² and Ismail Fliss^{3,*}

¹Unité de Protéomie Fonctionnelle & Biopréservation Alimentaire, Institut Supérieur des Sciences Biologiques Appliquées de Tunis, Université El Manar, Tunis, Tunisie ²UMR CNRS 8576 ‘Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle’, Université des Sciences et Technologie de Lille, Lille, France and ³Institut des Nutraceutiques et des Aliments Fonctionnels (INAF), Université Laval, Québec, Canada

Received June 20, 2008; Accepted September 18, 2008

ABSTRACT

Plants produce small cysteine-rich antimicrobial peptides as an innate defense against pathogens. Based on amino acid sequence homology, these peptides were classified mostly as α -defensins, thionins, lipid transfer proteins, cyclotides, snakin and hevein-like. Although many antimicrobial plant peptides are now well characterized, much information is still missing or is unavailable to potential users. The compilation of such information in one centralized resource, such as a database would therefore facilitate the study of the potential these peptide structures represent, for example, as alternatives in response to increasing antibiotic resistance or for increasing plant resistance to pathogens by genetic engineering. To achieve this goal, we developed a new database, PhytAMP, which contains valuable information on antimicrobial plant peptides, including taxonomic, microbiological and physicochemical data. Information is very easy to extract from this database and allows rapid prediction of structure/function relationships and target organisms and hence better exploitation of plant peptide biological activities in both the pharmaceutical and agricultural sectors. PhytAMP may be accessed free of charge at <http://phytamp.pfba-lab.org>.

INTRODUCTION

The first antimicrobial peptide from a eukaryotic organism, wheat α -purothionin, was discovered in 1942 by Balls and collaborators (1). The next peptide in this category was not reported until 30 years later and studies describing the discovery of new antimicrobial peptides from plant

tissues have become numerous only in recent years (2). Antimicrobial peptides (AMPs) are cysteine-rich short amino acid sequences common in the seeds of many species (3). Plant AMPs are grouped into several families and many share general features, such as an overall positive charge, the presence of disulfide bonds (which stabilize the structure) and a mechanism of action targeting outer membrane structures, such as ion channels. In addition to their role in host defense and their appeal as simple models for studying the molecular mechanism of antimicrobial peptide action, AMPs have the potential to combat pathogens, including those showing increased resistance to conventional antimicrobial compounds. These peptides usually have broad-spectrum antimicrobial activity against pathogenic fungi and thus are promising candidates for managing diseases in sensitive transgenic plants (4). Although many plant AMPs are now well characterized, much physicochemical and structural information is still missing, unavailable to potential users or buried in the scientific literature. The majority of sequenced AMPs are stored in the manually annotated UniProtKB/Swiss-Prot which represents a large database with broad domains. Thus, there is a clear need to gather, filter and critically evaluate this mass of information and store into smaller, more specialized, resources so that it can then be used in a way that enhances efficiency. Few different databases have been created for antimicrobial peptides and are mentioned in the literature. ANTIMIC (5) database is currently inactive. The Antimicrobial Peptide Database (APD) (6) contains general information about peptides of all types having antibacterial, antifungal or antiviral activities and originating from either eukaryotic or prokaryotic cells. Plant AMPs are not described with sufficient details in this database. A centralized resource, such as a database designed specifically for plant AMPs would facilitate the comprehensive investigation of their structure/activity associations and potential uses. This could have implications not only for the genetic

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +1 418 656 2131 (ext. 6825); Fax: +1 418 656 3353; Email: Ismail.Fliss@fsaa.ulaval.ca

2 Nucleic Acids Research, 2008

improvement of plants by increased resistance to pathogens, but also for the development of new drugs for medical use.

CONSTRUCTION AND CONTENT

Database construction and methods

PhytAMP runs on a Windows NT platform (Microsoft Windows 2000) with the Apache web server (version 2.0.54), MySQL server (v 5.0.30) and PHP (v 4.3.11). The web server and all parts of the database are hosted at the Centre de Calcul El Khawarizmi (CCK), Tunisia. Antimicrobial plant peptide sequences were collected from the UniProt database (7) and from the scientific literature using PubMed. Microbiological information was collected from the literature by PubMed search. Since not all known AMPs sequences were present in the ExPASy (<http://www.expasy.org/srs/>) SRS server or NCBI server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>), literature search was used to complete the PhytAMP sequence database. Sequences were retrieved in SciDBMaker (8) and curated and the resulting tables exported to the MySQL server. The FASTA program (9) was used for the sequence homology search in the database. The BLAST search (10) was implemented using the NCBI binaries. The Smith-Waterman search was implemented using the SSEARCH program from the FASTA3 distribution (9). The sequence alignment was done using various methods, such as ClustalW (v2.07) (11), MUSCLE (v3.6) (12) and T-Coffee (v1.37) (13). The Java platform is required for visualizing generated phylogenetic trees. The program HMMER was used for the implementation of hidden-profile Markov models (14). The peptides collected in this version of PhytAMP are mainly from natural sources. Precursor sequences were removed to keep only mature peptide sequences. For each peptide, a unique nine-digit identification number (ID) starting with the prefix PHYT was assigned. Each entry was checked in the Protein Data Bank (PDB) or UniProtKB/Swiss-Prot. A web link in PhytAMP to UniProt and PDB was created for all peptides that already exist in these databases, to facilitate consultation of the original databases. In addition, each entry contains general data, such as peptide name, sequence, class, plant taxonomy, activity data (bacterial, fungal or viral target) and relevant references in the UniProt. Additional physicochemical data are provided, including empirical formula, mass, length, isoelectric point, net charge, the numbers of basic, acidic, hydrophobic and polar residues, hydropathy index, binding potential index, instability index, aliphatic index, half-life in mammalian cells, yeast and *Escherichia coli*, cysteine and glycine content, extinction coefficient, absorbance at 280 nm, absent and most prevalent amino acids, secondary (α -helix or β -strand) and tertiary structure (when available), physical method used for structural determination (e.g. NMR spectroscopy or X-ray diffraction) and critical residues for activity, when information is available.

Web interface description

PhytAMP database is available at <http://phytamp.pfba-lab.org>. There are various ways to access to information related to a given peptide in PhytAMP database. The simplest way is to use the browse interfaces (general information, physicochemical data, structural data, taxonomy and literature). A quick search formula on the header part on 'browse' web pages is included for keyword search. An extended search interface (query for general information, physicochemical data, structural data, taxonomy and literature) is provided for combined search. Various tools and links are also provided including user sequence analysis interface, user sequence similarity search interface, statistical data, useful links and contact information (Figure 1). The query forms provide quick or advanced search with a variety of parameters. Users can find a specific antimicrobial plant peptide using its ID, name or UniProt ID, query for lists of organisms targeted by a plant AMP or for lists of AMPs that target a specific organism. Detailed information for each entry in the database can be viewed by clicking on the peptide name. The advanced search tool allows query of all available data. When a sequence is entered, the program returns all peptides containing this sequence and search results can be sorted into visible columns. A combinatorial search can be done by query of search results. Files containing the sequence (Fasta format) may be downloaded for all of the entries identified by the query, to facilitate other analyses. Registered users can also download output result tables in XLS, DOC, XML and CSV format. In addition, various tools including BLAST, FASTA and SSEARCH enable users to search the database for homologous sequences and save successful results temporarily in the server for subsequent access. Users may thus select some or all of the homologous sequences for multiple aligning with their submitted sequences. The statistical interface provides data on peptide sequence, function and structure. The average length, net charge and amino acid residue percentages for all entries in the database are also listed, as is the frequency of given values for each physicochemical parameter. For structural analysis, the number of peptides with a defined structural type is shown.

UTILITY AND DISCUSSION

Phylogenetic tree construction

Multiple sequence alignments of 271 plant antimicrobial peptides found in the PhytAMP were made using the CLUSTALW v2.07 program (11) and further refined manually. The parameters used in the CLUSTALW program were as follows: gap opening, 10; gap extension, 0.2; delay divergent sequence, 30%; DNA transition weight, 0.5; protein weight matrix, Gonnet series. Based on the initial alignment, a resample was performed by the generation of 1000 bootstrapped data sets using the SEQBOOT program (15). Genetic distances of the alignments were calculated using the Dayhoff PAM matrix with the PROTDIST program (15). Subsequently, the

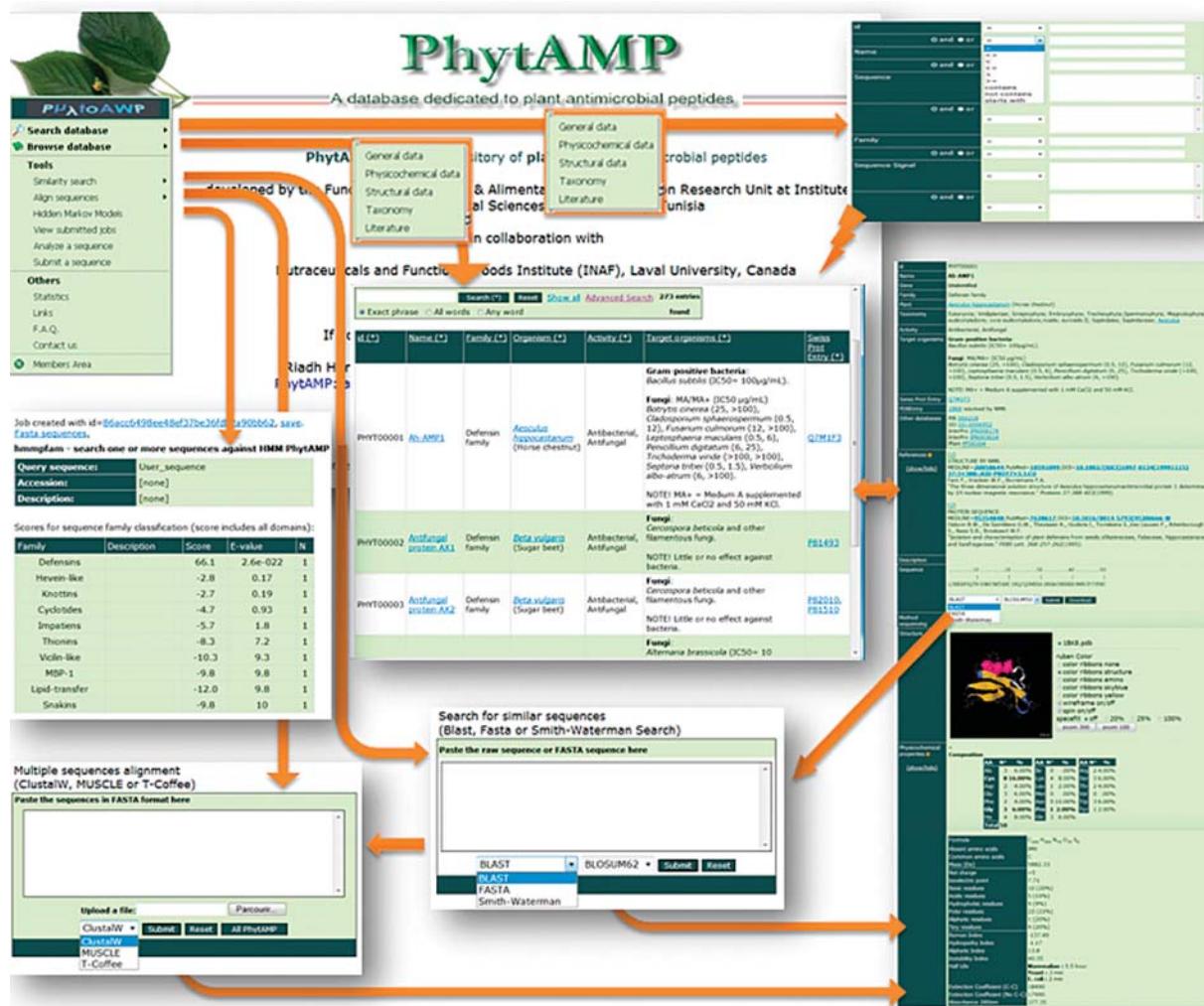


Figure 1. User interface of PhytAMP database.

trees were constructed by successive clustering of lineages using the neighbor-joining algorithm as implemented in the NEIGHBOR program [15]. Their strict consensus tree was obtained using the CONSENSE program [15]. The unrooted tree diagram was generated with the FigTree program (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). 3D structure data were obtained from the PDB (<http://www.rcsb.org/pdb>) and edited with the molecule analysis and molecule display (PyMOL) program (<http://www.pymol.org>).

The PhytAMP database

The current version of PhytAMP holds 271 antimicrobial plant peptides (AMPs), secreted by various families, such as Amaranthaceae [9], Andropogoneae [10], Brassicaceae [36], Oryzeae [11], Santalaceae [11], Spermacoceae [17], Triticeae [34], Vicieae [12] and Violaceae [51]. Classification has been proposed on the basis of primary structure [16, 17]. *Viola* (family Violaceae) and *Arabidopsis* (family Brassicaceae) appear to be the predominant

genera among AMP producers, although this may be due to the extensive studies on these species. Plant AMPs in the database are classified as cyclotides [76], defensins [55], Hevein-like [14], Impatiens [4], knottins [4], lipid-transfer proteins [45], shepherins [2], snakin [20], thionins [43] or vicilin-like [6], MBP-1 (18) and beta-barellin (19). An unrooted tree of the AMPs was generated, as shown in Figure 2. It is noteworthy that only 69% of the peptides have been sequenced directly, the remaining structures having been predicted from genome sequences. For 83.4%, the amino acid sequence length varies from 20–67 (Figure 3). Table 1 summarizes the amino acid percentages. It is generally presumed that AMPs are cysteine-rich proteins and this was apparent in our statistical results. Glycine is also an abundant amino acid, 98.5% of these AMPs containing at least one glycine residue. The majority (84.9%) have net charges varying from 0 to +10, while <6% possess a positive charge superior to +10, the highest being +17 (PHYT00099). In addition, only 9.2% have a net negative charge, the

4 Nucleic Acids Research, 2008

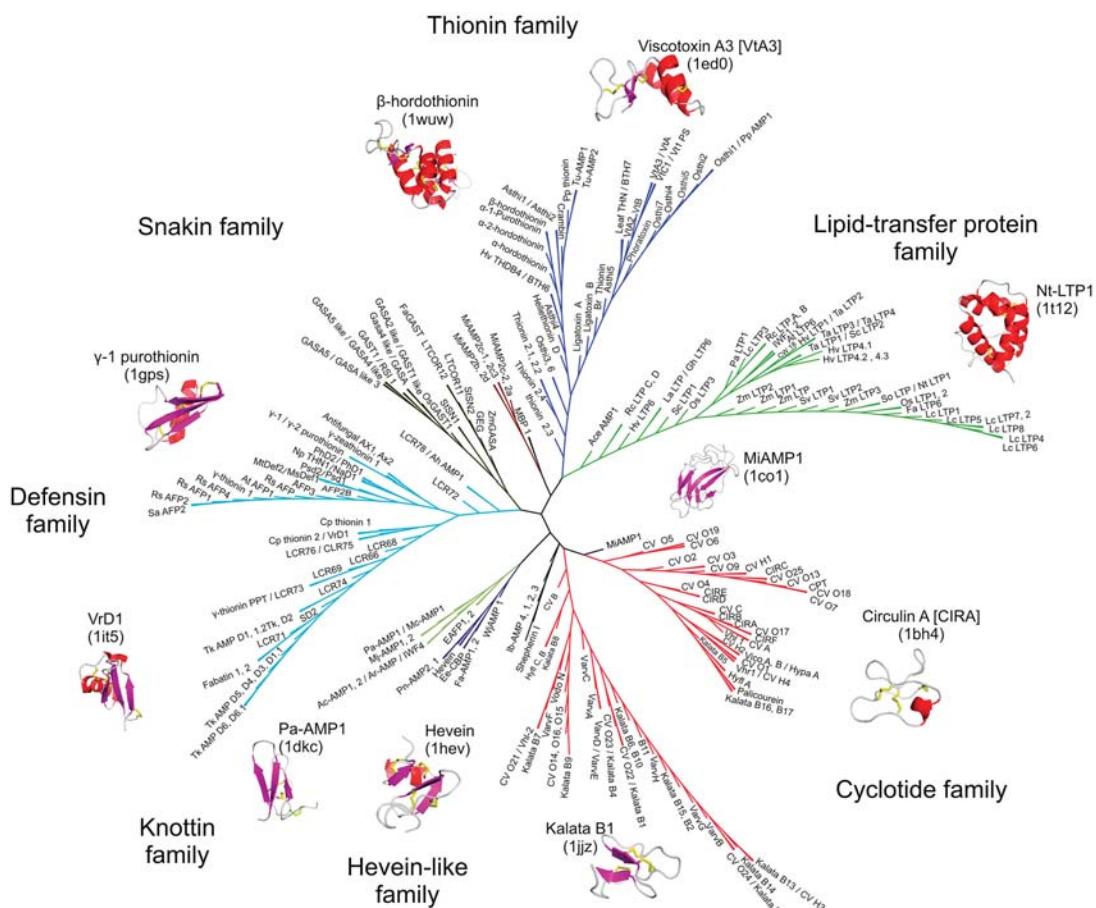


Figure 2. Unrooted phylogenetic tree of plant AMPs compiled in the PhytAMP database. A multiple sequence alignment of 271 plant AMPs was used to calculate a matrix with the genetic distances for each pair of the sequences. Based on this matrix, successive clustering of lineages was done to construct the unrooted tree with the neighbor-joining algorithm (8). Tree was generated using FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). 3D coordinates were obtained from the PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/>). PDB accession ID numbers—Viscotoxin A3: 1ed0; β -hordothionin: 1uwu; Nt-LTP1: 1t12; MiAMP1: 1co1; Circulin A: 1bh4; Kalata B1: 1jjz; Hevein: 1hev; Pa-AMP1: 1dkc; VrD1: 1it5; γ -1-purothionin: 1gps. Pictures were generated using PyMOL software [10]. α -helices and β -sheets are shown in red and purple, respectively.

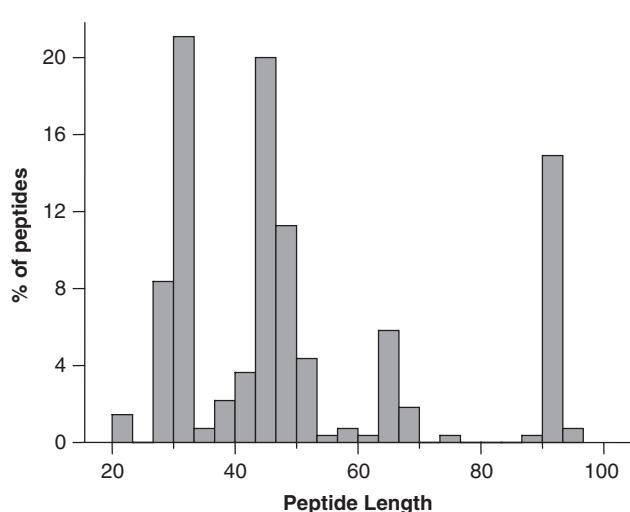


Figure 3. Histogram of peptide length distribution in the PhytAMP database.

Table 1. Amino acid occurrence in the PhytAMP database

Amino acid	Number of residues	% of total residues
C (cysteine)	1975	14.59
G (glycine)	1384	10.23
S (serine)	1185	8.76
A (alanine)	979	7.23
K (lysine)	896	6.62
T (threonine)	853	6.30
R (arginine)	819	6.05
P (proline)	817	6.04
N (asparagine)	743	5.49
V (valine)	610	4.51
I (isoleucine)	562	4.15
L (leucine)	549	4.06
Y (tyrosine)	414	3.06
Q (glutamine)	410	3.03
D (aspartic acid)	335	2.48
E (glutamic acid)	322	2.38
F (phenylalanine)	291	2.15
H (histidine)	194	1.43
W (tryptophan)	123	0.91
M (methionine)	73	0.54

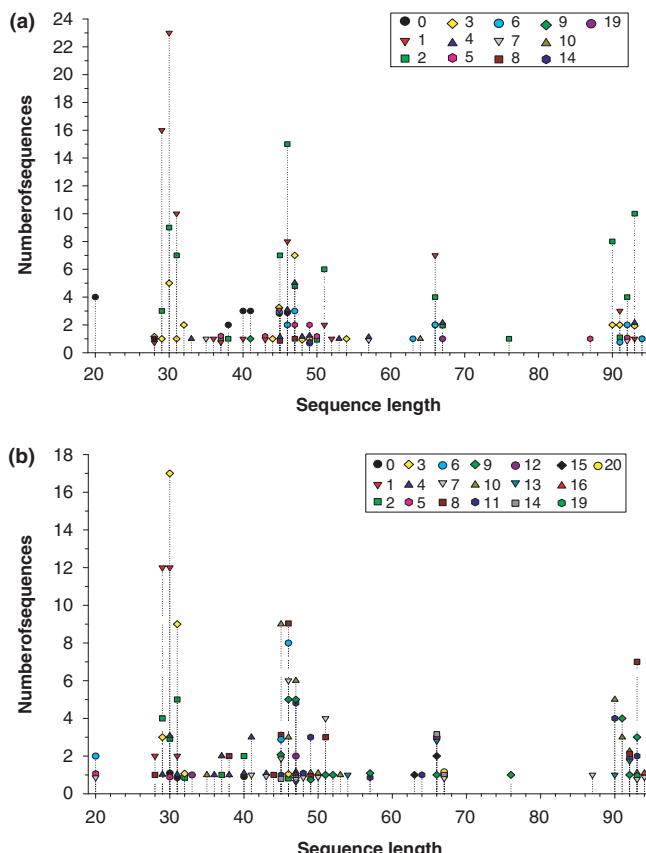


Figure 4. Correlation between acidic (a) and basic (b) amino acid content and sequence length among peptides in the PhytAMP database.

most negative being -6 (PHYT00259). As a result, the average net charge of all AMPs in PhytAMP is $+4.6$. Figure 4 shows the correlation between acidic (a) and basic (b) amino acid content and sequence length among peptides in the PhytAMP database. In general, peptides are randomly distributed across families, except sequence length 20 which correspond to cyclotide family and the cluster for sequence length about 90 which fall specifically in lipid-transfer protein family. The majority of sequences display a basic pattern, 53.1% having from 6–11 basic residues. In comparison, acidic residue content is more limited, 79.7% containing three or fewer acidic amino acids. Current analysis revealed that three quarters of the plant AMPs contain between 4 and 13 hydrophobic residues. Only 39 were found to have 3D structures filed in the PDB database and resolved by NMR spectroscopy, crystallography or molecular modeling. Some of them nevertheless possess more than one structure in the PDB database, bringing the total number of 3D entries to 102. Only 39.5% are tested for biological activity. The majority possesses antifungal (51%), antibacterial (33%) and anti-viral (10%) activities, as shown in Figure 5. These findings may be useful in isolating and characterizing novel plant AMPs or designing novel peptides with higher potency against pathogens or with broad antimicrobial spectra. As future development, we plan to integrate a system

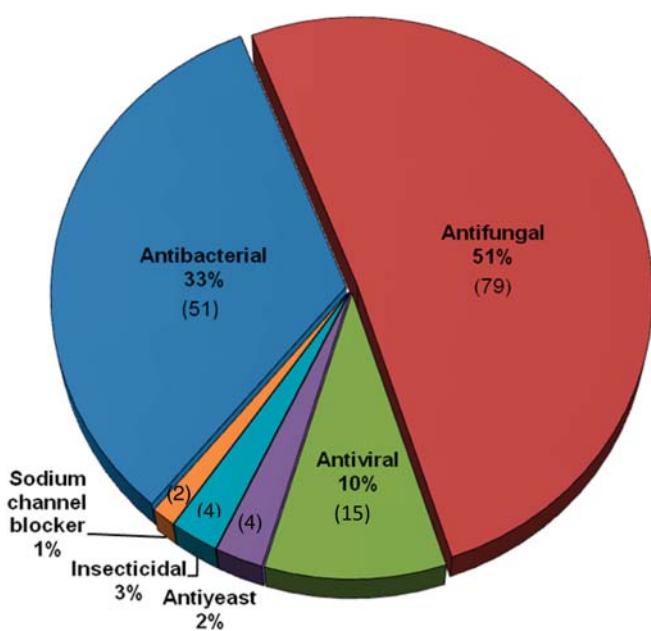


Figure 5. Chart of reported activities for plant peptides compiled in the PhytAMP database.

that will allow automatic prediction of the amino acids that are key to biological function and a server for building tertiary structures by homology with existent plant AMP structures.

CONCLUSION

PhytAMP allows all plant AMP sequence information and physicochemical or biological data to be accessed via a user-friendly, web-based interface. The database can be queried using various criteria and retrieval of microbiological or physicochemical data includes specific information on each peptide. The microbiological, physicochemical and structural properties thus provided should allow more comprehensive analysis of this group of antimicrobial peptides and enhance our understanding of plant defense biology. This could contribute not only to genetic improvement of plants by increased resistance to pathogens, but also has implications for the development of new drugs for medical use based on derivatives or analogs of natural antimicrobial peptides. PhytAMP currently contains 271 entries of plant AMPs and is expected to grow quickly with the rapid development of genomic and proteomic projects. As more information about plant AMPs becomes available, the database will be expanded and improved accordingly.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank Dr. Stephen Davids for his critical reading of the article.

6 Nucleic Acids Research, 2008

FUNDING

The Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada; the Ministry of Higher Education, Scientific Research and Technology, Republic of Tunisia.

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

1. Balls,A.K., Hale,W.S. and Harris,T.H. (1942) A crystalline protein obtained from a lipoprotein of wheat flour. *Cereal Chem.*, **19**, 279–288.
2. Broekaert,W.F., Terras,F.R., Cammue,B.P. and Osborn,R.W. (1995) Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol.*, **108**, 353–1358.
3. Broekaert,W.F., Cammue,B.P.A., De Bolle,M.F.C., Thevissen,K., De Samblanx,G.W. and Osborn,R.W. (1997) Antimicrobial peptides from plants. *Critical Rev. Plant Sci.*, **16**, 297–323.
4. Terras,F.R., Eggermont,K., Kovaleva,V., Raikhel,N.V., Osborn,R.W., Kester,A., Rees,S.B., Torrekens,S., Van Leuven,F., Vanderleyden,J. *et al.* (1995) Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *Plant Cell*, **7**, 573–588.
5. Brahmachary,M., Krishnan,S.P.T., Koh,J.L.Y., Khan,A.M., Seah,S.H., Tan,T.W., Brusic,V. and Bajic,V.B. (2004) ANTIMIC: a database of antimicrobial sequences. *Nucleic Acids Res.*, **32**, D586–D589.
6. Wang,Z. and Wang,G. (2004) APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Res.*, **32**, D590–D592.
7. The Universal Protein Resource (UniProt) (2007) *Nucleic Acids Res.*, **35**, D193–D197.
8. Hammami,R., Zouhir,A., Naghmouchi,K., Ben Hamida,J. and Fliss,I. (2008) SciDBMaker: new software for computer-aided design of specialized biological databases. *BMC Bioinformatics*, **9**, 121.
9. Pearson,W.R. and Lipman,D.J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **85**, 2444–2448.
10. Altschul,S.F., Madden,T.L., Schaffer,A.A., Zhang,J., Zhang,Z., Miller,W. and Lipman,D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3389–3402.
11. Thompson,J.D., Higgins,D.G. and Gibson,T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673–4680.
12. Edgar,R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 1792–1797.
13. Notredame,C., Higgins,D.G. and Heringa,J. (2000) T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.*, **302**, 205–217.
14. Durbin,R., Eddy,S., Krogh,A. and Mitchison,G. (1998) Biological Sequence Analysis: Probabilistic Models of Proteins and Nucleic Acids, Cambridge, Cambridge University Press.
15. Felsenstein,J. (1989) PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics*, **5**, 164–166.
16. Garcia-Olmedo,F., Molina,A., Alamillo,J.M. and Rodriguez-Palenzuela,P. (1998) Plant defense peptides. *Biopolymers*, **47**, 479–491.
17. Castro,M.S. and Fontes,W. (2005) Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein Pept. Lett.*, **12**, 13–8.
18. Duvick,J.P., Rood,T., Rao,A.G. and Marshak,D.R. (1992) Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from maize (*Zea mays L.*) kernels. *J. Biol. Chem.*, **267**, 18814–18820.
19. McManus,A.M., Nielsen,K.J., Marcus,J.P., Harrison,S.J., Green,J.L., Manners,J.M. and Craik,, D.J. (1999) MiAMP1, a novel protein from *Macadamia integrifolia* adopts a Greek key beta-barrel fold unique amongst plant antimicrobial proteins. *J. Mol. Biol.*, **293**, 629–638.

Chapitre 3

Potentiel antimicrobien d'extraits aqueux de trois plantes spontanées des régions arides de la Tunisie

Pharmaceutical Biology, sous presse (facteur d'impact 0.39)

Présentation

Les Extraits de graines de trois plantes, issues des régions arides de la Tunisie, *Juniperus phoenicea* L. (Cupressaceae), *Pistacia atlantica* Desf. (Anacardiaceae) et *Oudneya africana* R. Br. (Brassicaceae), ont été examinés pour leur pouvoir antimicrobien contre des bactéries pathogènes d'origine alimentaire. Les extraits aqueux sont préparés et sont ensuite précipités avec du méthanol ou de l'acétone. Les fractions extraites à l'acétone (pH 7.2) ont montré une activité antimicrobienne importante, surtout contre *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* et *Listeria ivanovii* (Gram-positive). Ces extraits sont aussi actifs contre les souches Gram-négatives *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Les extraits sélectionnés pour leur haut pouvoir antimicrobien étaient stables en présence des solvants organiques (chloroforme, hexane, acetonitrile, méthanol et acétone), aussi qu'après traitements thermiques à 100°C pour 30 min. *Listeria monocytogenes* LSD530 et *Escherichia coli* ATCC 25922 sont inhibées par les extraits de *Juniperus* et *Pistacia* avec une concentration minimale de 1.56 et 3.12 mg/mL respectivement. Cette étude établi le potentiel des plantes médicinales spontanées des régions arides de la Tunisie comme source d'agents antimicrobiens.

L'ensemble des résultats de cette troisième étude est développé dans la publication : «**Antimicrobial properties of aqueous extracts from three medicinal plants growing wild in arid regions of Tunisia**», (*Pharmaceutical Biology*, sous presse).

RESEARCH ARTICLE

Antimicrobial properties of aqueous extracts from three medicinal plants growing wild in arid regions of Tunisia

Riadh Hammami^{1,2}, Abdelmajid Zouhir¹, Jeannette Ben Hamida¹, Mohamed Neffati³, Gérard Vergoten², Karim Naghmouchi⁴, and Ismail Fliss^{1,4}

¹Unité de Protéomie Fonctionnelle et de Biopréservation Alimentaire, Institut Supérieur des Sciences Biologiques Appliquées de Tunis, Université El Manar, Tunisie, ²UMR CNRS 8576 'Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle', Université des Sciences et Technologie de Lille, France, ³Laboratoire d'Écologie Pastorale, Institut National des Régions Arides, Médenine, Tunisie, and ⁴Institut des Nutraceutiques et des Aliments Fonctionnels (INAF), Université Laval, Québec, Canada

Abstract

Seed extracts of three plant species that grow wild in the arid regions of Tunisia, *Juniperus phoenicea* L. (Cupressaceae), *Pistacia atlantica* Desf. (Anacardiaceae), and *Oudneya africana* R. Br. (Brassicaceae), were examined for antimicrobial activity against bacterial food pathogens. Aqueous extracts were prepared and then precipitated with methanol or acetone. Extracted acetone fractions (pH 7.2) showed powerful antimicrobial activity, especially against *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, and *Listeria ivanovii* (Gram-positive) and were also active against Gram-negative strains *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Extracts selected for high antimicrobial activity were stable in the presence of organic solvents (chloroform, hexane, acetonitrile, methanol, and acetone), and withstand thermal treatments up to 100°C for 30 min. *L. monocytogenes* LSD530 and *E. coli* ATCC 25922 appeared to be inhibited by *Juniperus* and *Pistacia* extracts with a minimum concentration of 1.56 and 3.12 mg/mL, respectively. This study established the potential of medicinal plants growing wild in arid regions of Tunisia as a source of antimicrobial agents.

Keywords: Food-borne pathogens; *Juniperus phoenicea*; *Oudneya africana*; *Pistacia atlantica*

Introduction

The incidence of bacterial infections in humans is becoming a major concern in both the food and medical sectors worldwide. Several factors may explain this development. Over-use of antibiotics in agriculture and medicine has led to the emergence of highly resistant pathogenic microorganisms, which now represent a very serious public health problem (Cohen, 1992; Walsh, 2000). In the food sector, the increasing prevalence of food pathogens in several food commodities is in large part due to a recent tendency to limit the use of traditional microbiological hurdles such as chemical additives and salt. For the safety of drug and food systems, the development of new antimicrobial agents is urgent. Over the past few decades, the search for new anti-microbial

agents has occupied many research groups in the field of ethnopharmacology (Wallace, 2004). Much focus has been on determining the antimicrobial activity of plant extracts found in folk medicine (Rios & Recio, 2005). Several antimicrobial agents have been isolated from plants including secondary metabolites (such as xanthones (Nkengfack et al., 2002), coumarins (Ouahou et al., 2004) and flavonoids (Komguem et al., 2005)) and peptides (thionins (Florack & Stiekema, 1994), defensins (Broekaert et al., 1995) and lectins (Wang & Ng, 1998)). Recently, ethanol extract from two *Eremophila* species containing antimicrobial compounds (terpenes and/or sterols) was used successfully to control the growth of *L. monocytogenes* in milk, and pâté as well as in Brie cheese (Owen & Palombo, 2007).

Address for Correspondence: Ismail Fliss, Dairy Research Centre STELA, Pavillon Paul-Comtois, Université Laval, Québec, Canada G1K 7P4. Tel.: (418) 656-2131; E-mail: ismail.fliss@aln.ulaval.ca

(Received 19 January 2008; revised 4 March 2008; accepted 6 April 2008)

2 Riadh Hammami et al.

In this study, the objective was to investigate the effect of antimicrobial compounds extracted from seeds of *Oudneya africana* R. Br. (Brassicaceae), *Juniperus phoenicea* L. (Cupressaceae), and *Pistacia atlantica* Desf. (Anacardiaceae), three wild plant species used for medicinal purposes in arid rural regions of Tunisia on food-borne pathogens. The plants were selected on the basis of ethnomedical application in the treatment of infections. The extracts were tested against common food-borne pathogens, including *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, and *Listeria innocua*. In addition, the physicochemical properties of active compounds were assessed, in an attempt to contribute to the use of these as alternative products for microbial control and food preservation.

Materials and methods

Selection and collection of plant materials

Three different plants, *Juniperus phoenicea*, *Pistacia atlantica*, and *Oudneya africana*, were collected from different localities in the region of Medenine, Tunisia in May 2001, May 2003, and April 2002, respectively. Voucher specimens are deposited in the Institute of Arid Regions of Tunisia Herbarium (Laboratoire d'Écologie Pastorale).

Preparation of plant extracts

All chemicals were of analytical grade. All extraction steps were done at 4°C. For each plant, 10g of mature seeds were air-dried and extracted by the following three methods. Method 1 (Zhang & Lewis, 1997) comprised powdering the seeds with a mortar and pestle, stirring the powder in 0.05 M sulfuric acid (3 mL g^{-1}) for 3 h, neutralizing the suspension with NaOH and removing the insoluble material by centrifugation at 10,000 g and subsequent microfiltration through a 0.22 μm membrane. For method 2 (Fujimura et al., 2003), the seeds were homogenized for 5 min with 100 mL of 0.05 M sodium acetate/acetic acid buffer (pH 4.8) in a Waring blender, stirred overnight and filtered through gauze and the filtrate was centrifuged at 10,000 g for 20 min. For method 3 (Song et al., 2004), seeds were homogenized in 0.02 M phosphate buffer (pH 7.2) containing 0.1 M NaCl, stirred overnight, filtered through gauze, adjusted to pH 4 with acetic acid (50%, v/v), stirred for 4 h and then centrifuged at 10,000 g for 40 min. These aqueous extracts were further treated by precipitation with methanol or acetone followed by evaporation to the initial aqueous volume. The initial aqueous extracts as well as those mixed with methanol or acetone and their precipitates were tested

for inhibitory activity against the food-borne pathogens listed below.

Characterization of the active compounds

The stability of the putative antimicrobial compounds under exposure to heat and organic solvents was evaluated for extract obtained by method 3 from the three plants. Extracts were thus boiled for 10, 20 or 30 min in a water bath or autoclaved (121°C) for 10 or 20 min. Solvent treatment consisted of mixing aqueous extracts with equal volumes of methanol, acetone, chloroform, hexane or acetonitrile for 2 h at room temperature, followed by evaporation to dryness and re-dissolving in 0.01 M phosphate buffer (pH 6). The residual activities of the extracts thus treated were measured by the critical dilution method as described below.

Assays for antimicrobial activity

Bacterial strains and media

Food-borne pathogens were provided by the Institut des Nutraceutiques et des Aliments Fonctionnels (INAF), Université Laval, Québec, Canada. Bacterial growth inhibition assays were performed using *Listeria ivanovii* (RBL30), *Listeria innocua* (RBL29), *Listeria monocytogenes* (LSD 530), *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442). All strains were grown in tryptic soy broth (Difco Laboratories, Sparks, MD) supplemented with 0.6% (w/v) yeast extract (TSB) and incubated aerobically at 30°C. Cultures were transferred at least three times before use.

Agar diffusion method

The agar diffusion method described by (Tagg et al., 1976) was used. Tryptic soy agar with 0.6% yeast extract (Difco Laboratories, Sparks, MD) was autoclaved, cooled to 45°C, seeded at 1% (v/v) with an overnight culture of the indicator strain in TSB and poured into sterile Petri plates (25 mL each). Plates were then placed at 4°C for solidification. Wells were bored in the agar using the wide end of a sterile Pasteur pipette and 80 μL of plant extract was dispensed into each well. Before incubation, all plates were held at 4°C for 2 h. The plates were then incubated at 30°C for at least 24 h to develop inhibition zones and the diameter of these was measured.

Critical dilution method and MIC determination

The critical dilution method described by Turcotte et al. (2004) was used. Briefly, a two-fold serial dilution of each extract in TSB was made in flat-bottomed 96-well polystyrene microplates (Microtest™, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ). Wells thus each contained 250 μL of dilution and were inoculated with 50 μL of overnight culture of the target bacteria diluted

56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110

to a concentration of approximately 10^6 CFU/mL. Plates were incubated at 30°C for 16 h and absorbance at 650 nm was measured using a Thermo-max spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). The MIC was calculated from the highest dilution showing complete inhibition of the tested strain (OD equals OD of the blank). The MIC determinations were repeated independently three times. The results are presented as the median of three independent repetitions.

Inhibition of 24 h growth in liquid culture

Microplate wells containing TSB with plant extract in serial two-fold dilution were inoculated with bacterial strain at 1% (v/v) and incubated at 30°C for 24 h. Optical density at 650 nm was measured hourly.

Statistical analyses

Data were analyzed by ANOVA using a SAS system procedure (SAS Institute, Cary, NC). A multiple comparison test (LSD) was used to test the significant differences between the treatment means ($P < 0.05$).

Results and discussion

Antimicrobial activity

The inhibitory activities of extracts of the three plants (5 mg/mL), as measured against the five pathogens by the agar diffusion test, are summarized in Table 1. The seeds of all three species of plant were thus found to contain antimicrobial agents, *J. phoenicea* appearing to be the most active. The three extraction methods showed variable effectiveness in extracting antimicrobial compounds, with method 3 being the most effective and yielding extract with a broad spectrum of activity. This method, which uses phosphate buffer, resulted in significant antibacterial activity against both Gram-positive and Gram-negative species, while the two other methods generated antimicrobial compounds active only against Gram-positive species. It was also noted that no precipitates showed any antimicrobial activity, while supernatants did. For all three methods, subsequent use of acetone or methanol resulted in a higher antimicrobial activity, especially for extract of *J. phoenicea* seeds. A potent substance also appears to have been concentrated by acetone in extract from *O. africana*.

Our work is the first to investigate the prevalence of antimicrobial compounds in plant species from the arid region of Tunisia. We have clearly shown that the spectrum of activity of these compounds depends a great deal on the extraction method used. In fact, while *P. atlantica* acid and acetate extracts were the most active against the test bacteria, only phosphate buffer

extract was capable of inhibiting both Gram-positive and Gram-negative bacteria. For *O. africana*, the initial aqueous extracts of which showed no antibacterial effect, the acetone-soluble fraction produced strong inhibition of *Listeria* in the case of acetate extraction and inhibited all five species in the case of phosphate extraction. The noticeable feature of the phosphate buffer extracts is thus their antimicrobial activity over a broad range of food-borne pathogenic bacteria. The results obtained in the course of the present study are in agreement to a certain degree with the traditional uses of the plants investigated.

Characterization of the antimicrobial compounds

Extracts obtained by method 3 were selected for a further characterization. The growth of *L. monocytogenes* and *E. coli* incubated with different concentrations of extracts of the three plants are shown in Figure 1. Dose-dependent inhibition curves were obtained and complete inhibition of both *L. monocytogenes* LSD 530 and *E. coli* ATCC 25922 was obtained with *Juniperus* and *Pistacia* extracts at a concentration of 12.5 mg/mL. As evident from Table 2, the MIC values ranged from 1.56 to 3.12 mg/mL for both *J. phoenicea* and *P. atlantica* extract, while *O. africana* had MICs values between 1.56 and 6.25 mg/mL. Incubation of the phosphate extracts with various solvents for two hours did not affect activity. Active extracts of *J. phoenicea* and *O. africana* were completely insensitive to treatment with acetone, methanol, acetonitrile, chloroform, and hexane. However, *Pistacia* extract was sensitive to chloroform and hexane with loss of 50 and 25% of residual activity, respectively. It seems worthwhile to mention that all three extracts remained active after heating at 100°C for 30 min, and the *Juniperus* and *Oudneya* extracts (the latter being concentrated by acetone precipitation) were still active even after heating at 121°C for 20 min, with 96 and 70% of residual activity, respectively. In comparison, the extract of *Pistacia* was still active after 10 min of treatment at 121°C (70% of residual activity) but not 20 min (no antimicrobial activity). Heat stability is a widely sought criterion for the selection of bioactive compounds. Our results have shown that the active principles in the plant extracts obtained in this study were quite resistant to heating, remaining at least partially active even after 20 min at 121°C. This heat stability would be a very useful characteristic, especially in the case of antimicrobial compounds to be used as food preservatives, since many food-processing procedures involve a heating step.

Phytochemical and further pharmacological studies are important tasks for the future in order to better understand the effects of these important pharmaceutical resources. In the present work, we have clearly demonstrated the potential of plants recovered from arid

56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110

4 Riadh Hammami et al.

Table 1. Antimicrobial activity of various extracts of *Juniperus phoenicea*, *Pistacia atlantica* and *Oudneya africana* as evaluated by the agar diffusion test.

Plant Species	Extraction method	Extract ^a	Bacterial inhibition zone radii				
			Li	Ln	Lm	Pa	Ec
<i>Juniperus phoenicea</i>							
	1	Aqueous	12.5±0.7	11.5±0.7	11.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	1	Acetone precipitate	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	1	Acetone supernatant	11.0±1.4	10.5±0.7	10.5±0.7	0.0±0.0	0.0±0.0
	1	Methanol precipitate	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	1	Methanol supernatant	10.5±0.7	10.5±0.7	10.5±0.7	0.0±0.0	0.0±0.0
	2	Aqueous	8.5±0.7	7.0±0.0	7.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	2	Acetone precipitate	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	2	Acetone supernatant	8.5±0.7	8.5±0.7	8.5±0.7	0.0±0.0	0.0±0.0
	2	Methanol precipitate	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	2	Methanol supernatant	8.0±0.0	9.0±0.0	7.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	3	Aqueous	10.5±0.7	10.5±0.7	9.5±0.7	9.5±0.7	9.5±0.7
	3	Acetone precipitate	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	3	Acetone supernatant	15.5±0.7	13.5±0.7	13.5±0.7	11.5±0.7	9.5±0.7
	3	Methanol precipitate	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	3	Methanol supernatant	17.0±0.7	13.0±1.4	13.5±0.7	8.5±0.7	8.5±0.7
<i>Pistacia atlantica</i>							
	1	Aqueous	8.0±0.0	8.0±0.0	8.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	1	Acetone precipitate	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	1	Acetone supernatant	8.5±0.7	8.5±0.7	8.5±0.7	0.0±0.0	0.0±0.0
	1	Methanol precipitate	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	1	Methanol supernatant	11.5±0.7	9.5±0.7	9.5±0.7	0.0±0.0	0.0±0.0
	2	Aqueous	13.5±0.7	11.5±0.7	6.5±0.7	0.0±0.0	0.0±0.0
	2	Acetone precipitate	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	2	Acetone supernatant	14.0±0.0	10.0±0.0	9.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	2	Methanol precipitate	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	2	Methanol supernatant	9.0±0.7	9.5±0.7	6.5±0.7	0.0±0.0	0.0±0.0
	3	Aqueous	6.5±0.7	10.0±0.0	10.5±0.7	8.0±0.0	10.0±0.0
	3	Acetone precipitate	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	3	Acetone supernatant	9.0±1.4	8.5±0.7	10.0±0.0	8.5±0.7	9.5±0.7
	3	Methanol precipitate	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	3	Methanol supernatant	14.0±0.0	12.0±0.0	12.0±0.0	6.5±0.7	8.0±0.0
<i>Oudneya africana</i>							
	1	Aqueous	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	1	Acetone precipitate	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	1	Acetone supernatant	6.5±0.7	6.5±0.7	6.5±0.7	0.0±0.0	0.0±0.0
	1	Methanol precipitate	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	1	Methanol supernatant	6.5±0.7	6.5±0.7	6.5±0.7	0.0±0.0	0.0±0.0
	2	Aqueous	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	2	Acetone precipitate	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	2	Acetone supernatant	16.0±1.4	13.5±0.7	13.5±0.7	0.0±0.0	0.0±0.0
	2	Methanol precipitate	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	2	Methanol supernatant	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	3	Aqueous	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	3	Acetone precipitate	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	3	Acetone supernatant	11.5±0.7	11.0±0.0	11.0±0.0	8.0±0.0	9.5±0.7
	3	Methanol precipitate	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	3	Methanol supernatant	0.0±0.0	6.5±0.7	6.5±0.7	6.5±0.7	6.5±0.7
Antibiotic	Ampicillin (0.05 mg/mL)		11.5±0.7	11.0±1.4	12.5±0.7	6.5±0.7	17.5±1.4

^aConcentration adjusted to 5 mg/mL.Li: *Listeria ivanovii* RBL30; Ln: *Listeria innocua* RBL29; Lm: *Listeria monocytogenes* LSD530; Pa: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442; Ec: *Escherichia coli* ATCC 25922.56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110

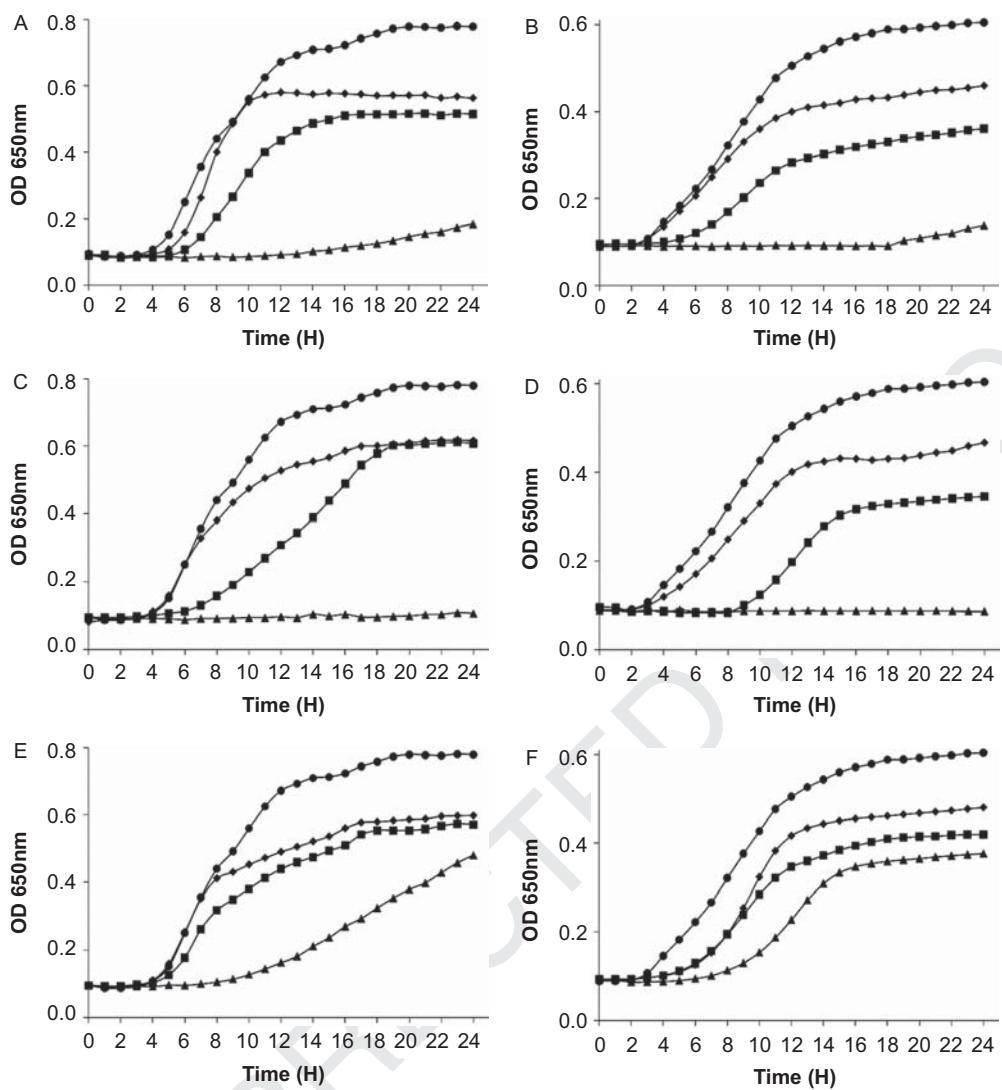


Figure 1. Growth of *Listeria monocytogenes* (A, C, E) and *Escherichia coli* (B, D, F) in the presence of extracts (by method 3) of seeds of (A, B) *Juniperus phoenicea*, (C, D) *Pistacia atlantica* and (E, F) *Oudneya africana* (acetone-soluble portion) in tryptic soy broth. Concentrations (mg/mL) of extract were 12.5 (triangle), 6.25 (square), 3.125 (diamond) and 0 (circle).

Table 2. Determination of MIC of selected plant extracts against food-borne pathogens.

Strains	Minimal inhibitory concentration (mg/mL)			
	<i>J. phoenicea</i>	<i>P. atlantica</i>	<i>O. africana</i>	Antibiotic
	JP-M3	PA-M3	OA-M3-AS	Ampicillin
<i>L. monocytogenes</i>	1.56	1.56	1.56	0.016
<i>L. ivanovii</i>	1.56	1.56	1.56	0.016
<i>L. innocua</i>	1.56	3.12	1.56 - 3.12	0.016
<i>E. coli</i>	3.12	1.56	1.56 - 3.12	0.004 - 0.008
<i>P. aeruginosa</i>	3.12	3.12	3.12 - 6.25	> 0.128

regions of Tunisia as a source of antimicrobial agents. We have also shown that some of these compounds have a broad spectrum of antimicrobial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. The results

of this study are quite encouraging; these compounds may offer a promising alternative for purposes of food preservation. Further studies in progress aim to examine the mode of action of these compounds within the scope of challenge tests in foodstuffs.

Acknowledgements

This research was supported by the Ministry of Higher Education, Scientific Research and Technology, Republic of Tunisia.

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110

References

- Broekaert WF, Terras FR, Cammue BP, Osborn RW (1995): Plant defensins: Novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol* 108: 1353–1358.
- Cohen ML (1992): Epidemiology of drug resistance: Implications for a post-antimicrobial era. *Science* 257: 1050–1055.
- Florack DE, Stiekema WJ (1994): Thionins: Properties, possible biological roles and mechanisms of action. *Plant Mol Biol* 26: 25–37.
- Fujimura M, Minami Y, Watanabe K, Tadera K (2003): Purification, characterization, and sequencing of a novel type of antimicrobial peptides, Fa-AMP1 and Fa-AMP2, from seeds of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.). *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 1636–1642.
- Komguem J, Meli AL, Manfouo RN, Lontsi D, Ngounou FN, Kuete V, Kamdem HW, Tane P, Ngadjui BT, Sondengam BL, Connolly JD (2005): Xanthones from *Garcinia smeathmannii* (Oliver) and their antimicrobial activity. *Phytochemistry* 66: 1713–1717.
- Nkengfack AE, Mkounga P, Meyer M, Fomum ZT, Bodo B (2002): Globulixanthones C, D and E: three prenylated xanthones with antimicrobial properties from the root bark of *Sympmania globulifera*. *Phytochemistry* 61: 181–187.
- Ouahouo BM, Azebaze AG, Meyer M, Bodo B, Fomum ZT, Nkengfack AE (2004): Cytotoxic and antimicrobial coumarins from *Mammea africana*. *Ann Trop Med Parasitol* 98: 733–739.
- Owen RJ, Palombo EA (2007): Anti-listerial activity of ethanolic extracts of medicinal plants, *Eremophila alternifolia* and *Eremophila duttonii*, in food homogenates and milk. *Food Control* 18: 387–390.
- Rios JL, Recio MC (2005): Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol* 100: 80–84.
- Song X, Zhou Z, Wang J, Wu F, Gong W (2004): Purification, characterization and preliminary crystallographic studies of a novel plant defensin from *Pachyrhizus erosus* seeds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60: 1121–1124.
- Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW (1976): Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev* 40: 722–756.
- Turcotte C, Lacroix C, Kheadr E, Grignon L, Fliss I (2004): A rapid turbidometric microplate bioassay for accurate quantification of lactic acid bacteria bacteriocins. *Int J Food Microbiol* 90: 283–293.
- Wallace RJ (2004): Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proc Nutr Soc* 63: 621–629.
- Walsh C (2000): Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 406: 775–781.
- Wang H, Ng TB (1998): Ribosome inactivating protein and lectin from bitter melon (*Momordica charantia*) seeds: Sequence comparison with related proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 253: 143–146.
- Zhang Y, Lewis K (1997): Fabatins: New antimicrobial plant peptides. *FEMS Microbiol Lett* 149: 59–64.

Chapitre 4

Activité antimicrobienne et mode d'action d'un extrait peptidique d'*Oudneya africana*

Microbiology and Immunology, accepté (facteur d'impact 1.29)

Présentation

Une étude précédente a montré que l'extrait de graines d'*Oudneya africana* R. Br., une plante spontanée issues des régions arides de la Tunisie, présente un pouvoir antimicrobien contre des bactéries pathogènes d'origine alimentaire. Dans le but d'extraire, de purifier et de caractériser physico-chimiquement et microbiologiquement de nouveaux peptides produits par *Oudneya africana* ayant un large spectre antimicrobien contre les pathogènes d'origine alimentaire. Une extraction suivie de précipitation acétonique a été réalisée sur les graines de la plante. L'extrait obtenu, de faible masse moléculaire, s'est avéré actif contre plusieurs pathogènes incluant *Listeria ivanovii*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Erwinia chrysanthemi*, *Staphylococcus aerus*, *Enterococcus hirae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans*. L'extrait présente une sensibilité aux protéases. Le traitement de l'extrait d'AS-3000 avec la chymotrypsine et la proteinase K induit une perte d'environ 73% et 71% de l'activité antimicrobienne, respectivement. Des expériences de microscopie électronique à balayage ont montré l'effet lytique du peptide sur les cellules de *Listeria ivanovii* et *Escherichia coli*. Des tests de l'effet synergique de la combinaison de l'extrait peptidique AS-3000 avec les antibiotiques (ampicilline, chloramphénicol, érythromycine, gentamicine, pénicilline G, Streptomycine, tétracycline et vancomycine) a été réalisé. L'indice FIC a été calculé ce qui a permis de comparer l'effet de la combinaison de chacun de ces antibiotiques avec l'extrait de plante AS-3000. L'effet obtenu varie selon l'antibiotique utilisé et est généralement additif. De plus l'effet pharmacodynamique de l'extrait peptidique AS-3000 avec la pénicilline a été analysé. Ainsi, l'analyse de l'effet post-antibiotique (PAE) a montré une augmentation de 2.3 fois (à partir de 3h en 7h). Cette étude établi le potentiel des plantes médicinales spontanées des régions arides de la Tunisie comme source d'agents antimicrobiens.

Les travaux de recherche du quatrième chapitre de la partie expérimentale font l'objet d'un manuscrit qui vient d'être accepté pour publication dans *Microbiology and Immunology* (révisions mineures).

Riad Hammami

De: onbehalfof@scholarone.com de la part de mai@wiley.com
Envoyé: lundi 9 mars 2009 03:05
À: riadh.hammami@fst.rnu.tn
Cc: mai@wiley.com
Objet: Microbiology and Immunology - Decision on Manuscript ID MAI-2008-231

08-Mar-2009

Dear Dr. Hammami:

Manuscript ID MAI-2008-231 entitled "A new antimicrobial peptide isolated from Oudneya africana seeds" which you submitted to Microbiology and Immunology, has been reviewed. The comments of the reviewer(s) are included at the bottom of this letter.

The reviewer(s) have recommended some minor revisions to your manuscript. Therefore, I invite you to respond to the reviewer(s)' comments and revise your manuscript.

To revise your manuscript, log into <http://mc.manuscriptcentral.com/mai> and enter your Author Center, where you will find your manuscript title listed under "Manuscripts with Decisions." Under "Actions," click on "Create a Revision." Your manuscript number has been appended to denote a revision.

You will be unable to make your revisions on the originally submitted version of the manuscript. Instead, revise your manuscript using a word processing program and save it on your computer. Please also highlight the changes to your manuscript within the document by using bold or colored text.

Once the revised manuscript is prepared, you can upload it and submit it through your Author Center.

When submitting your revised manuscript, you will be able to respond to the comments made by the reviewer(s) in the space provided. You can use this space to document any changes you make to the original manuscript. In order to expedite the processing of the revised manuscript, please be as specific as possible in your response to the reviewer(s).

IMPORTANT: Your original files are available to you when you upload your revised manuscript. Please delete any redundant files before completing the submission.

Because we are trying to facilitate timely publication of manuscripts submitted to Microbiology and Immunology, your revised manuscript should be uploaded as soon as possible. If it is not possible for you to submit your revision in a reasonable amount of time, we may have to consider your paper as a new submission.

Once again, thank you for submitting your manuscript to Microbiology and Immunology and I look forward to receiving your revision.

Sincerely,
Dr. Mineo Watanabe
Associate Editor, Microbiology and Immunology mai@wiley.com

Associate Editor Comments to Author:

Associate Editor
Comments to the Author:

This is a well-written paper containing interesting results which merit publication. For the benefit of reader, however, a number of points need clarifying and certain statements require further justification. These are given below by our reviewers. I believe their comments will make your manuscript more valuable.

A new antimicrobial peptide isolated from *Oudneya africana* seeds

Hammami Riadh^{1,2,3}, Ben Hamida Jeannette¹, Vergoten Gérard², Lacroix Jean-Marie²,
Slomianny Marie-Christine², Mohamed Neffati⁴, Fliss Ismail^{3*}

¹Unité de Protéomie Fonctionnelle et de Biopréservation Alimentaire, Institut Supérieur des Sciences Biologiques Appliquées de Tunis, Université Tunis El Manar, Tunisie

²UMR CNRS 8576 «Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle», Université des Sciences et Technologie de Lille, Lille, France

³Institut des Nutraceutiques et des Aliments Fonctionnels (INAF), Université Laval, Québec, Canada

⁴Laboratoire d'Écologie Pastorale, Institut National des Régions Arides, Médenine, Tunisie

* Correspondence:

Département des aliments et de nutrition, Université Laval, G1K 7P4 Québec, Canada
1(877)785-2825 ext. 6825; FAX +1 418 656-3353; E-mail: ismail.fliss@fsaa.ulaval.ca

Running Title: Antimicrobial peptides from *Oudneya africana*

1 **Abstract**

2 *Oudneya africana* R. Br. (Brassicaceae), a wild-growing plant in the arid region of
3 Tunisia is used ethnomedicinally for treating microbial infections. In this context, a
4 validation of the ethnotherapeutic claims of the plant was assessed by investigating for
5 its antimicrobial activity. A proteinaceous seed fraction, AS-3000 was identified and
6 showed a widespread activity against various Gram positive and Gram negative bacteria
7 including *L. monocytogenes*, *E. coli*, *B. subtilis*, *E. hirae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, and
8 *C. albicans*. This AS-3000 fraction exhibits a synergistic effect when combined to
9 various antibiotics. The post-antibiotic effect (PAE) of combined ampicillin/AS-3000
10 extract resulted in a 2.3 fold increase in the inhibition effect. The AS-3000-mode of
11 action on *Listeria* and *Escherichia* was also investigated using scanning electron
12 microscopy (SEM). These results support the use of *O. africana* to treat microbial
13 infections.

14

15

16 **Keywords:** *Oudneya africana*, plant extract, antimicrobial peptides, scanning electron
17 microscopy, synergism level, Post-antibiotic effect

18

1 **1. Introduction**

2 The increasing resistance of pathogenic micro-organisms to antibiotics is one of the
3 most serious public health problems for the present and the future (1). The widespread
4 resistance of dangerous microbes to conventional antibiotics has prompted renewed
5 interest in the use of natural alternatives such as bacterial interference (probiotics),
6 bacteriophage therapy, and antimicrobial peptides (AMPs). Particularly, AMPs are
7 promising candidates with many benefits including their toxic selectivity towards
8 pathogens, bactericidal properties, and low risk of resistance development (2). In recent
9 years, many antimicrobial peptides have been discovered in animals, insects, and plants
10 (3). These molecules, which are either constitutive or inducible, are recognized as
11 important components of the innate defense system (4). Plants should be an excellent
12 source of potent antimicrobials, since they are exposed to a wide range of
13 phytopathogenic microbes present in their environment and have had to develop
14 antimicrobial compounds to survive.

15 Plants produce small cysteine-rich antimicrobial peptides as an innate defense against
16 pathogens (5). Based on amino acid sequence homology, these peptides were classified
17 mostly as α -defensins (6), thionins (7), lipid transfer proteins, cyclotides, snakins and
18 hevein-like. These classes of peptides were newly centralized in a database named
19 PhytAMP (8). Search for new antibacterial agents should be continued by screening
20 many plant families. In recent years, there has been increased focus on determining the
21 antimicrobial activity of plant extracts used in folk medicine (9). The screening of plant
22 extracts and plant products for antimicrobial activity has shown that higher plants
23 represent a potential source of novel antibiotic prototypes (9).

1 Native plants of the arid regions of the Sahara has been used for centuries, either
2 through selective extraction of the most sought-after species, the use of extensive areas
3 of land for grazing, or through direct clearing for farming or conversion to pasture.
4 Although the arid regions of the Sahara contain one of the most threatened ecosystems
5 on the planet, few ethnobotanical and phytochemical studies have been undertaken
6 there. The recovery of the knowledge and practices associated with these plant
7 resources are part of an important strategy linked to the conservation of biodiversity, the
8 discovery of new medicines, and the bettering of the quality of life of rural
9 communities.

10 In a previous work we have screened three wild plant species, *Oudneya africana* R. Br.
11 (Brassicaceae), *Juniperus phoenicea* L. (Cupressaceae) and *Pistacia atlantica* Desf.
12 (Anacardiaceae) used for medicinal purposes in arid rural regions of Tunisia, for the
13 presence of antimicrobial compounds with inhibitory activity against foodborne
14 pathogens. The plants were selected on the base of its ethnomedical application in the
15 treatment of infections. We have shown that some of these compounds, especially those
16 isolated from *Oudneya africana*, have a broad spectrum of antimicrobial activity against
17 both Gram-positive and Gram-negative bacteria (10). The current study was designed to
18 characterize biologically active extract from *Oudneya africana*, an endemic Saharan
19 plant of the Brassicaceae family, at physicochemical and biological levels. Active
20 extract was tested against various micro-organisms comprising *Listeria ivanovii*,
21 *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Dickeya dadantii*, *Staphylococcus aureus*,
22 *Enterococcus hirae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces*
23 *cerevisiae* and *Candida albicans*. In addition, its action on sensitive bacteria was then

1 assessed. Finally, the possible synergistic effects when associated with antibiotics were
2 studied.

3 **2. Materials and methods**

4 **2.1. Selection and collection of plants material**

5 *Oudneya africana* R. Br. (Brassicaceae) is an endemic plant of Sahara and is used in
6 folk medicine by local people to treat wound cicatrisation. Except the report by Stocker
7 et al. (11), there is a lack of information about this specie which still badly known. The
8 plant was collected from different localities in the region of Medenine, Tunisia during
9 April 2005. Voucher specimens were deposited at the Institute of Arid Regions (IRA),
10 Medenine, Tunisia.

11 **2.2. Preparation of extracts**

12 *Oudneya africana* seeds (10g) were homogenized in 0.02 M phosphate buffer (pH 7.2)
13 containing 0.1 M NaCl, stirred overnight, filtered with 0.45 µm membrane filter
14 (Sartorius, France), adjusted to pH 4.0 with acetic acid (50%, v/v), stirred for 4 h and
15 then centrifuged at 10,000 $\times g$ for 40 min (10). The aqueous extract was further treated
16 by precipitation with acetone followed by evaporation to the initial aqueous volume.
17 This extract was then concentrated using a Vivaspin 20 concentrator (3 kDa molecular-
18 weight cutoff, Sartorius, France) at 8000 $\times g$ and both fractions were recovered. The
19 filtrate was named AS-3000. The initial aqueous extract, the mixed with acetone as well
20 as Vivaspin fractions were tested for inhibitory activity against the microorganisms
21 listed below. Protein concentrations were determined in triplicate by the Lowry method
22 (12) with bovine serum albumin (Sigma, MO, USA) as a standard. All plant extracts
23 were stored at -20°C until testing.

1 **2.3. Test microorganisms and media**

2 The microorganisms' growth inhibition assays were performed using cultures of
3 *Listeria ivanovii* HPB28, *Listeria monocytogenes* LSD530, *Bacillus subtilis* PYZ9,
4 *Dickeya dadantii* EC3937, *Staphylococcus aureus* ATCC6533, *Enterococcus hirae*
5 ATCC10541, *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC19442,
6 *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. Strains were grown in tryptic soy
7 broth (TSB; Difco Laboratories, Sparks, MD) supplemented with 0.6% (w/v) yeast
8 extract and incubated aerobically at 30°C. The microbial strains were propagated at
9 least three times in TSB before use.

10 **2.4. Effects of proteolytic enzymes and pH on antimicrobial activity**

11 Protease treatment was for 2 h with trypsin (10,000 U mg⁻¹), α -chymotrypsin (42 U mg⁻¹)
12), pronase E (10 U mg⁻¹) or proteinase K (8 U mg⁻¹) from Sigma (St. Louis, MO, USA)
13 dissolved in the corresponding buffers supplied by Sigma. The protease concentration in
14 the reaction solutions was 1 mg/ml. Treatment was at 37°C for pronase and proteinase
15 K and 25°C for trypsin and α -chymotrypsin. Controls were run with bovine serum
16 albumin instead of protease. The mixtures were boiled for 3 min to terminate enzyme
17 activity. The residual activities of the extracts thus treated were measured by the critical
18 dilution method as described below. The activity of the extract at different pH values
19 was estimated by adjusting the pH of samples to pH 3-12. After the treatments, the
20 samples were tested for antimicrobial activity against indicator strain.

21 **2.5. Assays for Antimicrobial activity**

22 **2.5.1. Agar diffusion method**

23 The agar diffusion method described in our previous paper (10) was used.

1 **2.5.4. Effect of *Oudneya* extract on cell lysis**

2 To investigate the mode of action of active extract, the indicator strain was grown at
3 30°C for 14–16h in Tryptic soy agar with 0.6% yeast extract. The cells were then
4 washed and suspended in sterile 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.0. Bacterial
5 suspension (125 µl) was placed in microtitre plate wells. To this cell suspension,
6 concentrated active extract solution (125 µl) was added to final concentrations of 0.313,
7 0.625, 1.25 and 2.5 mg ml⁻¹. As a control, a sample without extract activity was used.
8 Samples and controls of the same final volume were incubated at 30°C for 6h.
9 Absorbance at 650 nm was measured using a Thermomax microplate reader (Molecular
10 Devices, Opti-Ressources, Charny, QC, Canada). Percentage of cell lysis was calculated
11 as 100 – (A_t/A₀ x 100), where A₀ and A_t were absorbance measured at 0 and 6 or 18h of
12 incubation, respectively.

13 **2.5.2. Minimal inhibitory concentration (MIC) evaluation**

14 The MIC was determined by the use of a Microtest™ polystyrene microplate assay (96
15 well Microtest, Becton Dickinson Labware) (10). To evaluate the effect of plant extract
16 AS-3000 in combination with antibiotics, increasing concentrations (with a 2-fold step,
17 i.e., 0.125, 0.25,..., 1024 µg/mL) of these antibiotics were added to medium containing
18 AS-3000 extract at 0.1 × MIC. Tubes containing an identical amount of medium, but
19 free from antibiotics and AS-3000 extract, and tubes separately containing the antibiotic
20 or AS-3000 extract were included in each assay as a growth control. After 24 h of
21 incubation at 30°C, the lowest antibiotic concentration in combination with AS-3000
22 extract that prevented the development of turbidity was regarded as the MIC.

1 **2.5.3. Inhibition of 24-hour growth in liquid culture**

2 Microplate wells containing TSB with plant extract in serial two-fold dilution were
3 inoculated with bacterial strain at 1% (v/v) and incubated at 30°C for 24 hours. Optical
4 density at 650 nm was measured hourly.

5 **2.5.4. SDS-PAGE analysis and in situ detection of the inhibition activity**

6 Aliquots of active fraction of *Oudneya africana* extract were separated by tricine
7 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) as described
8 by Schagger and von Jagow (13). Samples were suspended in 125 mmol l⁻¹ tris pH 6.8
9 containing 1 g l⁻¹ SDS, 20% (v/v) glycerol, and then applied to 17% of polyacrylamide
10 gels. To observe peptide bands, gels were stained with Coomassie brilliant blue R 250.
11 For in situ detection of inhibitory activity, the gel was washed with sterile water and
12 placed onto a sterile dish, then overlaid with soft agar containing 10⁶ cells ml⁻¹ of *L.*
13 *ivanovii* and incubated overnight at 30°C. The presence of clearing zones was then
14 observed.

15 **2.5.5. Effect of divalent cations on *Oudneya africana* extract**

16 Cells from overnight cultures of *L.ivanovii* and *E.coli* were harvested by centrifugation
17 and washed three times with 50 mmol of morpholine ethane sulfonic acid (MES) buffer
18 (pH 6.5) (Sigma). Thereafter, cells were resuspended in 0.1% (1 ml) of the same buffer
19 containing divalent cations (10 mmol), divalent cations plus 20 mmol of
20 ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) (Sigma) to chelate divalent cations such as
21 CaCl₂, MgSO₄ and MnSO₄. Active extract was then added to *L. ivanovii* and *E. coli*
22 strains at a final concentration of 0.78 and 1.56 mg ml⁻¹, respectively. Cells were
23 incubated at 30°C for 30 min. At the end of incubation, cells were tenfold serially

1 diluted in peptone water (0.1%, w/v) and appropriate dilutions were plated on TSEYB
2 agar and incubated at 30°C for 18 h.

3 **2.5.6. Scanning electron microscope observations**

4 The control and treated cells of each pathogen were examined by scanning electron
5 microscopy (S.E.M.) to visualize any morphological change that occurred in the cell
6 following exposure to AS-3000 plant extract. SEM observations were carried out on
7 cells after 16 h incubation in Tryptic soy agar with 0.6% yeast extract at 30°C. The
8 suspension was divided into two portions and AS-3000 extract was added to one portion
9 so as to achieve a concentration of 2 mg ml⁻¹. The other portion was left untreated as a
10 control. After 5 min, the cells from both tubes were harvested by centrifugation (5000 g,
11 10 min, 4°C), and washed 3x in PBS (pH 7.4). Cells were then microencapsulated in
12 agarose (3%, w/v), and fixed for 2 h at 4°C in 0.05% glutaldehyde (Marivac Ltd.,
13 Halifax, NS, Canada) and 2.5% paraformaldehyde in 0.1 mol l⁻¹ sodium cacodylate
14 buffer at pH 7.2 (JBSCHEM, Dorval, PQ, Canada) and examined with a 1200 EX
15 microscope (JEOL, Peabody, MA) at 80 kV.

16 **2.5.7. Evaluation of the synergistic effect of antibiotics and *O. africana* plant
17 extract**

18 Antimicrobial combinations are considered to be synergistic if the effect of combination
19 is greater than the effect of either agent alone or greater than the sum of the effects of
20 individual agents. Antagonism results if the combination provides an effect less than the
21 effect of either agent alone or less than the sum of the effects of the individual agents.
22 This evaluation was done according to Muroi and Kubo (14). Used antibiotics were
23 purchased from Oxoid Inc., Canada. Antimicrobial mechanisms of the antibiotics used

here were variable including the protein synthesis inhibitors (chloramphenicol, erythromycin, gentamicin, streptomycin and tetracycline) and bacterial cell wall synthesis inhibitors (ampicillin, penicillin G, and vancomycin). Aliquots of 100 µl of bacterial cultures (10^6 cells ml⁻¹) grown in 10 ml of Tryptic soy agar with 0.6% yeast extract for 6 h were inoculated in Tryptic soy agar supplemented with the antibiotics with different concentrations of plant extracts, based on MIC values that had previously been evaluated. The inhibitory activity was measured by the critical dilution method against *L. ivanovii* and *E.coli*. The growth conditions were the same as previously mentioned. To evaluate the activity of drug combinations, fractional inhibitory concentration (FIC) indices were calculated as follows (15): FIC index = FIC_{Antibiotic} + FIC_{AS-3000} = (MIC of Antibiotic in combination/MIC of Antibiotic alone) + (MIC of AS-3000 extract in combination/MIC of AS-3000 extract alone). The interpretation was made as follows: synergy (FIC index \leq 0.5), no interaction (0.5 < FIC index \leq 4), and antagonism (FIC index > 4) (16). Experiments were performed in triplicate.

2.5.8. Determination of the post-antibiotic effect

Strains was grown in Tryptic soy agar with 0.6% yeast extract for 12 h at 30°C (OD600 = 0.1), then the equivalent of 10^6 CFU/ml was incubated for 30 min at 30°C with or without ampicillin ($1 \times$ MIC), AS-3000 extract ($0.1 \times$ MIC), and a combination of both. Control experiments were performed simultaneously. Bacteria were then diluted 1000-fold with the same medium to remove the antibiotic and AS-3000 extract and incubated at 30 °C. The controls were treated similarly. Samples were obtained at time = 0 and then every hour thereafter until turbidity developed, reflecting bacterial growth. Aliquots were removed at each sampling time, and a 0.1 mL sample of each dilution was spread onto nutrient agar for CFU/mL determination. The number of CFUs was

1 determined after 24 h at 30 °C. The PAE was defined in accordance with Craig and
2 Gudmundsson (17) as $\text{PAE} = T - C$, where T is the time required for the viable cell
3 counts of the exposed bacteria to increase by a factor of \log_{10} from the initial time,
4 immediately after washing, and C is the corresponding time for cells unexposed to
5 antibiotics and AS-3000 extract (control). Experiments were performed in triplicate.

6 **2.6. Statistical analysis**

7 Data were analysed by an ANOVA using an SAS system procedure (SAS Institute Inc.,
8 Cary, NC). A multiple comparison test (LSD) was used to test the significant
9 differences between the treatment means ($P < 0.05$).

10 **3. Results**

11 Aqueous extract from the seeds of *Oudneya africana* was assessed for its antimicrobial
12 activity against *Listeria ivanovii*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Dickeya*
13 *dadantii*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus hirae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*
14 *aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. While, the crude extract
15 was inactive against tested micro-organisms, a potent substance appears to have been
16 concentrated by acetone in the initial extract (preliminary results, not shown). Further
17 fractionation of active extract resulted in an important antimicrobial activity in fraction
18 AS-3000. This fraction with very low molecular mass (<3kDa) shows a widespread
19 activity against tested micro-organisms. The inhibitory activities of AS- 3000 extract, as
20 measured against the ten micro-organisms by the agar diffusion test, are presented in
21 Table 1. The MIC values of the AS-3000 are shown in Table 1. The MIC values of the
22 AS-3000 extract was the same (0.313 mg ml^{-1}) against *B. subtilis*, *E. hirae*, *P.*
23 *aeruginosa*, *D. dadantii*, whereas the MIC values of AS-3000 extract against *S. aureus*,

1 *S. cerevisiae* and *C. albicans* were 0.313 mg ml⁻¹, 0.65 mg ml⁻¹ and 1.25 mg ml⁻¹,
2 respectively. The lower MIC values of AS-3000 extract were against *L. ivanovii* (0.078
3 mg ml⁻¹), *L. monocytogenes* (0.156 mg ml⁻¹) and *E. coli* (0.156 mg ml⁻¹). This suggests
4 that *L. ivanovii* and *E. coli* showed greater sensitivity towards the compounds presents
5 in the seeds extracts of *O. africana* plant. The growth of *L. ivanovii*, *E. coli* strains
6 incubated with different concentrations of AS-3000 extract (2 x MIC, 4 x MIC, and 8 x
7 MIC) of the *O. africana* plant is shown in Figure 1. Dose-dependent inhibition curves
8 were obtained.

9 **3.1. Effects of proteolytic enzymes and pH on antimicrobial activity, direct
10 detection in gel**

11 Acid hydrolysis of AS-3000 extract, followed by ninhydrin test gave positive result. In
12 order to test the effect of proteolytic enzymes, AS-3000 extract was tested for
13 sensitivity to trypsin, chymotrypsin, proteinase K, and pronase E and residual activity
14 was measured by the critical dilution method against *L. ivanovii* HPB28. The extract
15 was sensitive to tested proteases. Treatment of AS-3000 samples with chymotrypsin and
16 proteinase K resulted in loss of average 73% and 71% of activity. Trypsin induced a
17 loss of average 62% of antimicrobial activity. However, AS-3000 extract was not
18 sensitive to pronase E. The AS-3000 extract was active over a pH range of 5.0 - 9.0, but
19 was inactivated when incubated outside these limits (data not shown). *Oudneya*
20 *africana* seeds extract was previously shown to be heat resistant (10). SDS-PAGE
21 analysis of AS-3000 fraction revealed a single active band with a molecular weight
22 lower than 2.5 kDa (Fig. 2). Recently, three novel antimicrobial peptides were isolated
23 from green coconut water showing molecular masses of 858Da, 1249Da and 950Da,

1 respectively (18). The identified peptides were efficient against both Gram-positive and
2 Gram-negative bacteria, as in case of our peptidic extract.

3 **3.2. Effect of divalent cations on AS-3000 action**

4 In the absence and presence of AS-3000 extract, cell viability of *L. ivanovii* strains was
5 9.25 ± 0.04 and 8.25 ± 0.05 log CFU per ml, respectively. Similar results found for *E.*
6 *coli* strains with values 9.12 ± 0.02 and 8.35 ± 0.05 log CFU per ml in the absence and
7 presence of AS-3000 extract, respectively. Addition of different divalent cations such as
8 CaCl_2 , MgSO_4 and MnSO_4 resulted in the reduction of lethality of both *L. ivanovii* and
9 *E. coli* strains to (0.55, 0.72 and 0.70) and (0.41, 0.50 and 0.56) log CFU per ml,
10 respectively (Fig. 3). Interestingly, the addition of chelating agent EDTA restored the
11 listericidal activity of AS-3000 extract of 0.15, 0.42, and 0.17 log CFU per ml, in
12 presence of CaCl_2 , MgSO_4 , and MnSO_4 , respectively. Similar results were obtained for
13 *E. coli* with 0.05, 0.40, and 0.22 log CFU per ml, in presence of CaCl_2 , MgSO_4 , and
14 MnSO_4 , respectively.

15 **3.3. Effect of AS-3000 extract on cell lysis**

16 The effect of AS-3000 extract at concentrations of 0.313, 0.625, 1.25 and 2.5 mg ml^{-1}
17 on cell lysis of *L. ivanovii* and *E. coli* is shown in Fig. 4. Six hours of contact with cells
18 at $0.313, 0.625 \text{ mg ml}^{-1}$ AS-3000 extract concentrations had a little effect on the lysis of
19 both *L. ivanovii* and *E. coli* strains but a noticeable effect on the lysis of sensitive strains
20 ($30.1\% \pm 1.41$ to $35.2\% \pm 1.2$) at the higher concentrations. Eighteen hours of contact
21 produced $25.8\% \pm 1.6$ to $81.9\% \pm 1.41$ lysis of the *L. ivanovii* and $20.3\% \pm 0.43$ to
22 $80.8\% \pm 1.2$ lysis of *E. coli*, all in a concentration-dependent manner.

1 **3.4. Scanning electron microscopy**

2 The scanning electron microscopy (SEM) images of not treated *L. ivanovii* revealed
3 regular rod-shaped cells with a continuous uniform cell wall (Fig. 5a) whereas a
4 treatment with AS-3000 extract at a concentration of 2 mg ml⁻¹ caused cell wall damage
5 (Fig. 5b). Furthermore, the damaged cells showed dispersed intracellular material likely
6 attributable to the destruction of a major part of the bacterial cell wall. Micrographs of
7 control cells showed the typical rod-shaped morphology of *E. coli* (Fig. 5c). Two
8 micrograms per ml of AS-3000 extract, which induces complete killing (Fig. 5d), had
9 the most drastic effects on the membrane. The outer membrane appeared to be broken in
10 such way that the inner- and outer membranes were fused.

11 **3.5. Evaluation of the synergistic effect of antibiotics and plant extract on the**
12 **bacteria samples**

13 Although the antimicrobial activity of *Oudneya africana* extract AS-3000 has not been
14 relatively high, synergism assays were carried out for it and the synergism rate of AS-
15 3000 extract combined to various antibiotics was evaluated (Table 2). Antimicrobial
16 mechanisms of the antibiotics used here were variable including the protein synthesis
17 inhibitors and bacterial cell wall synthesis inhibitors. The synergism level of tested
18 antibiotics with AS-3000 plant extract on *L.ivanovii* was found to be in the following
19 order: chloramphenicol = vancomycin > ampicillin > gentamicin = tetracycline >
20 streptomycin = penicillin G > erythromycin. Similarly, chloramphenicol showed the
21 highest synergism level with AS-3000 extract on *E.coli* strain. Among the tested
22 antibiotics, erythromycin showed the weakest synergism level with the *Oudneya* plant
23 extract on both *L.ivanovii* and *E.coli* strains. The results of the present study seem to be
24 promising and may enhance the natural plant products uses, showing the potential of

1 these plants in the treatment of infectious diseases. Future studies on the chemical
2 characteristics of this promising peptidic extract AS-3000 should be carried out.

3 **3.6. Post-Antibiotic Effect (PAE)**

4 Ampicillin and AS-3000 extract alone had a PAE of 3 h and 4 h, respectively, whereas
5 the combination of ampicillin and AS-3000 extract showed a somewhat longer PAE of
6 7 h (Fig.6). Therefore, the combination resulted in a 2.3-fold increase in PAE (from 3 to
7 7 h). To date, the majority of extracts and phytochemical studies have focused on
8 bactericidal or bacteriostatic activity. However, it is important to consider whether these
9 products are sustainable over a prolonged period and whether they affect
10 pharmacodynamic parameters, such as PAE. Our findings showed a remarkably long
11 PAE of approximately 7 h for ampicillin and AS-3000 extract against *L. ivanovii*
12 compared with the control (3 h).

13 **4. Discussion**

14 During last decade, much attention has been directed toward extracts and biologically
15 active compounds isolated from popular plant species. The antimicrobial effects of plant
16 extracts have been well studied (19, 20). These natural products are classified as GRAS
17 (generally recognized as safe). The use of medicinal plants plays a vital role in covering
18 the basic health needs in developing countries, and these plants may offer a new source
19 of anti-infective products.

20 In this work, we have characterized an antimicrobial compounds from *Oudneya*
21 *africana*, an endemic medicinal plant of North African Sahara, contains peptidic
22 compounds with interesting antimicrobial properties. We have also shown that *Oudneya*

1 *africana* plant extract exhibits a very large spectrum of activity including Gram negative
2 and gram positive bacteria, fungi and yeast.

3 **Acknowledgments**

4 The authors are grateful to Dr. NEFFATI Mohamed for providing plant material. This
5 work was supported in part by the Ministry of Higher Education, Scientific Research
6 and Technology, Republic of Tunisia.

7 **References**

- 8 1. Yang, D.; Biragyn, A.; Kwak, L. W.; Oppenheim, J. J., Mammalian defensins in
9 immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol* **2002**, 23, (6), 291-6.
- 10 2. Pereira, H.A., Novel therapies based on cationic antimicrobial peptides. *Curr Pharm
11 Biotechnol* **2006**, 7, (4), 229-34.
- 12 3. Reddy, K. V.; Yedery, R. D.; Aranha, C., Antimicrobial peptides: premises and
13 promises. *Int J Antimicrob Agents* **2004**, 24, (6), 536-47.
- 14 4. Boman, H. G., Innate immunity and the normal microflora. *Immunol Rev* **2000**, 173,
15 5-16.
- 16 5. Dangl, J. L.; Jones, J. D., Plant pathogens and integrated defence responses to
17 infection. *Nature* **2001**, 411, (6839), 826-33.
- 18 6. Broekaert, W. F.; Terras, F. R.; Cammue, B. P.; Osborn, R. W., Plant defensins:
19 novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol*
20 **1995**, 108, (4), 1353-8.
- 21 7. Florack, D. E.; Stiekema, W. J., Thionins: properties, possible biological roles and
22 mechanisms of action. *Plant Mol Biol* **1994**, 26, (1), 25-37.
- 23 8. Hammami, R.; Ben Hamida, J.; Vergoten, G.; Fliss, I., PhytAMP: a database

- 1 dedicated to antimicrobial plant peptides. *Nucleic Acids Res* **2008**, 37(Database issue),
2 D963-D968.
- 3 9. Rios, J. L.; Recio, M. C., Medicinal plants and antimicrobial activity. *J*
4 *Ethnopharmacol* **2005**, 100, (1-2), 80-4.
- 5 10. Hammami, R.; Zouhir, A.; Ben Hamida, J.; Neffati, M.; Vergoten, G.; Naghmouchi,
6 K.; Fliss, I., Antimicrobial properties of Aqueous Extracts from three medicinal plants
7 growing wild in arid regions of Tunisia. *Pharmaceutical Biology* **2009**, (in press).
- 8 11. Stocker, P.; Yousfi, M.; Salmi, C.; Perrier, J.; Brunel, J.M.; Moulin, A., Maackiain
9 3-O-(6'-O-malonylbeta-D-glucopyranoside) from *Oudneya africana*, a powerful
10 inhibitor of porcine kidney acylase I. *Biochimie* **2005**, 87, (6), 507-12.
- 11 12. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J., Protein measurement
12 with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **1951**, 193, (1), 265-75.
- 13 13. Schagger, H.; von Jagow, G., Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel
14 electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal*
15 *Biochem* **1987**, 166, (2), 368-79.
- 16 14. Muroi, H.; Kubo, I., Antibacterial activity of anacardic acid and totarol, alone and in
17 combination with methicillin, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J*
18 *Appl Bacteriol* **1996**, 80, (4), 387-94.
- 19 15. Mackay, M. L.; Milne, K.; Gould, I. M., Comparison of methods for assessing
20 synergic antibiotic interactions. *Int J Antimicrob Agents* **2000**, 15, (2), 125-9.
- 21 16. Odds, F.C., Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. *J*
22 *Antimicrob Chemother* **2003**, 52, 1.
- 23 17. Craig, W. A.; Gudmundsson, S., *Postantibiotic effect. In Antibiotics in laboratory*
24 *medicine*. The Williams & Wilkins Co.: New York, 1996.

- 1 18. Mandal, S. M.; Dey, S.; Mandal, M.; Sarkar, S.; Maria-Neto, S.; Franco, O.L.,
2 Identification and structural insights of three novel antimicrobial peptides isolated from
3 green coconut water. *Peptides* **2009**, doi:10.1016/j.peptides.2008.12.001
4 19. Cowan, M.M., Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* **1999**, 12,
5 564–82.
6 20. McKay, D.L. ; Blumberg, J.B., A review of the bioactivity and potential health
7 benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytother Res* **2006**, 20, (7), 519-30.
8

1 **Figure legends**

2 **Figure 1:** Mode action of *Oudneya africana* extracts against *Listeria ivanovii* HPB28

3 (a) and *Escherichia coli* (b)

4 **Figure 2:** Direct detection on gel. Tricine SDS-PAGE and in situ activity assay of AS-

5 3000 extract. (A) The gel was stained with Coomassie brilliant blue R 250, and the

6 peptide molecular weight standard is shown on the left lane. (B) The gel was washed

7 with sterile water, overlaid with soft agar containing the indicator strain, and incubated

8 overnight to show inhibition zones.

9 **Figure 3:** Effect of MgSO₄, CaCl₂ and MnSO₄ combined with AS-3000 on *Listeria*

10 *ivanovii* (black) and *Escherichia coli* (gray). Cells were treated at 30°C for 30 min in

11 morpholineethanesulfonic acid buffer in the absence and presence of AS-3000 extract

12 (0.78 and 1.56 mg ml⁻¹, respectively), 20 mmol EDTA and 10 mmol MgSO₄, CaCl₂ and

13 MnSO₄. Values are means of duplicate experiments.

14 **Figure 4:** Lysis of *Listeria ivanovii* strain, and *Escherichia coli* in contact with AS-

15 3000 extract at concentrations of 0.313, 0.625, 1.25, and 2.5 mg ml⁻¹ for 6 h and 18 h at

16 30°C. Error bars represent the standard deviation calculated from duplicate experiments.

17 **Figure 5:** Electron micrographs of thin sections of the *Listeria ivanovii* (a) and *E. coli*

18 (b) strains grown to logarithmic growth phase. Respectively, panels c and d show the *L.*

19 *ivanovii* and *E. coli* strain with AS-3000 extract at a concentration of 2 mg ml⁻¹.

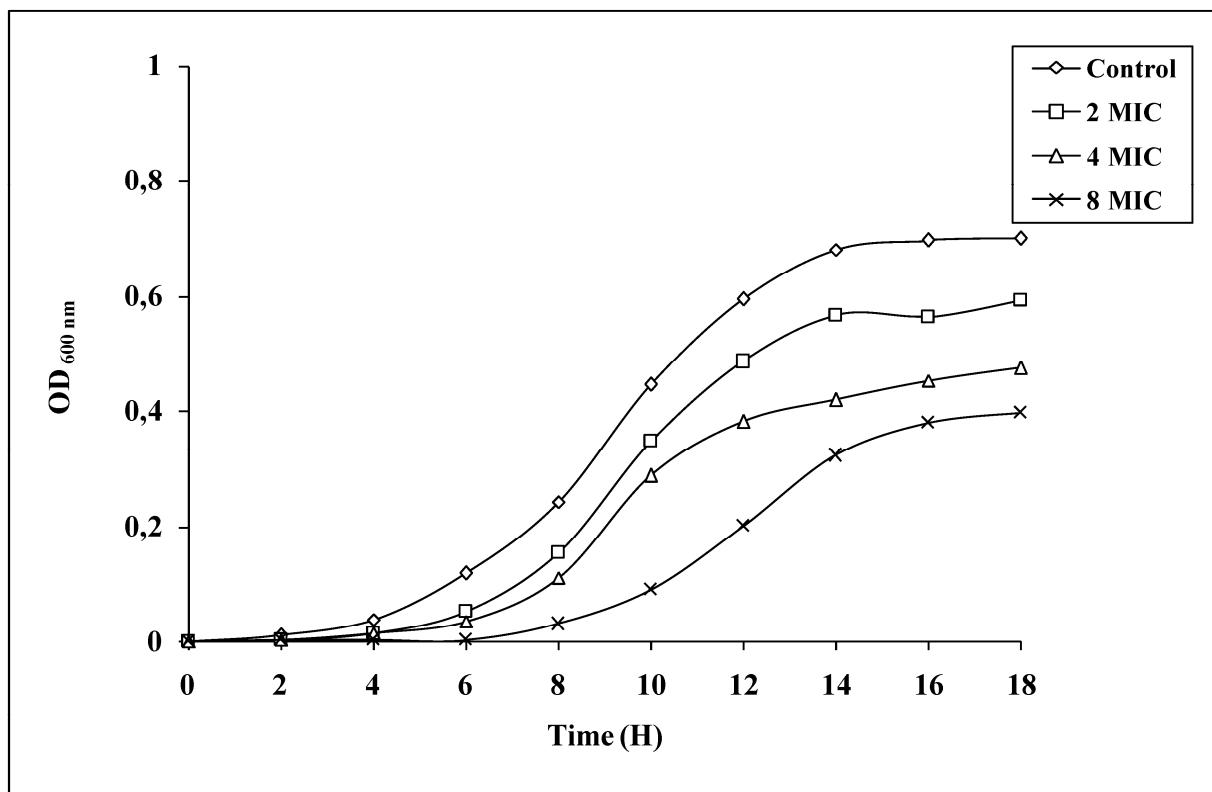
20 **Figure 6:** The post-antibiotic effect (PAE) of AS-3000 extract alone, ampicillin alone,

21 and their combination on *L. ivanovii* HPB28. Bacteria growing without antibiotic and

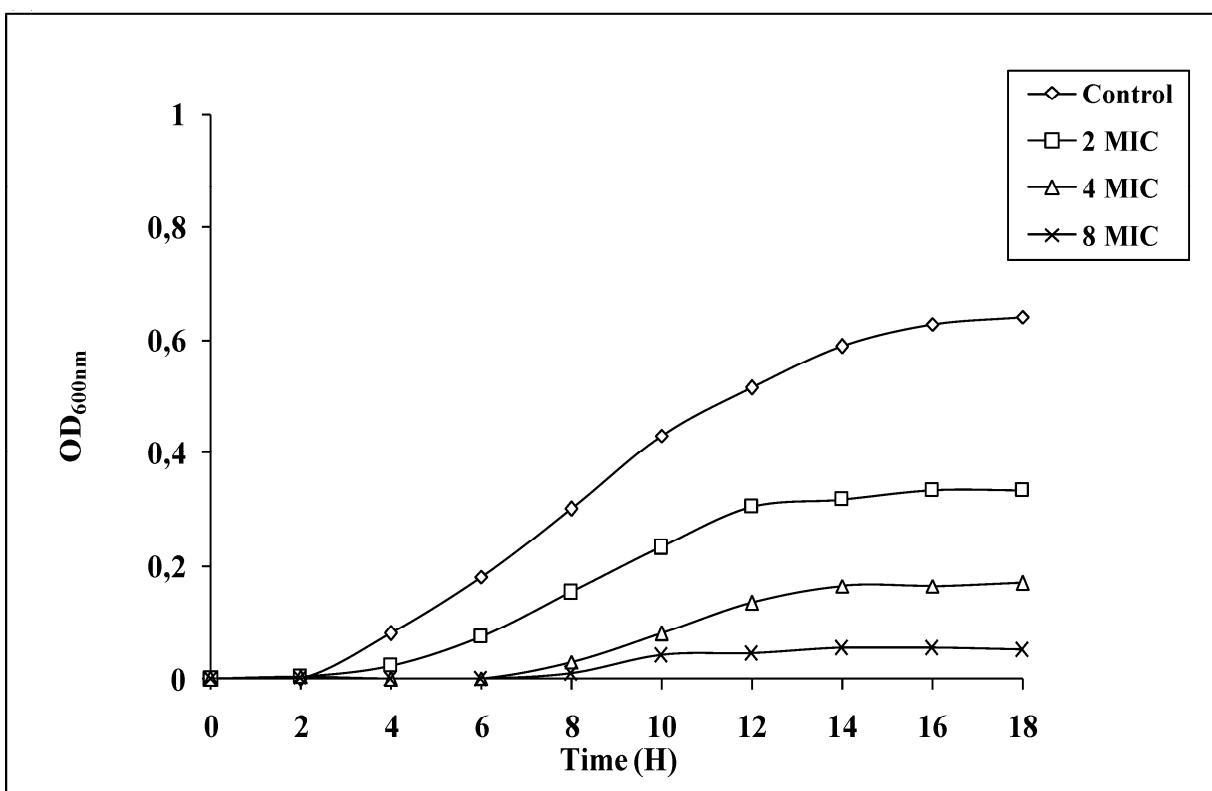
22 AS-3000 is represented by the control curve.

23

1 (a)



2
3 (b)



4
5 **Figure 1**

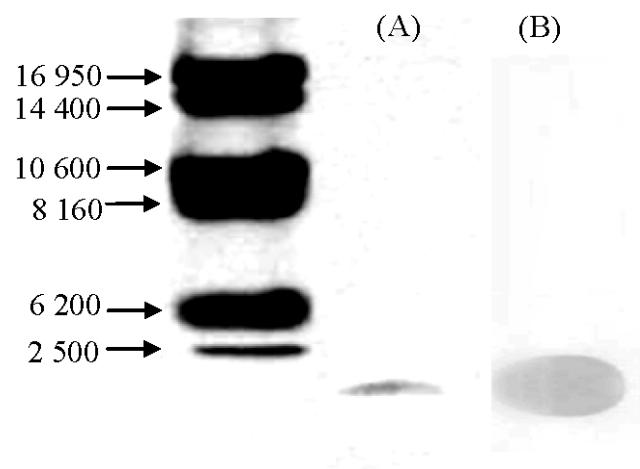
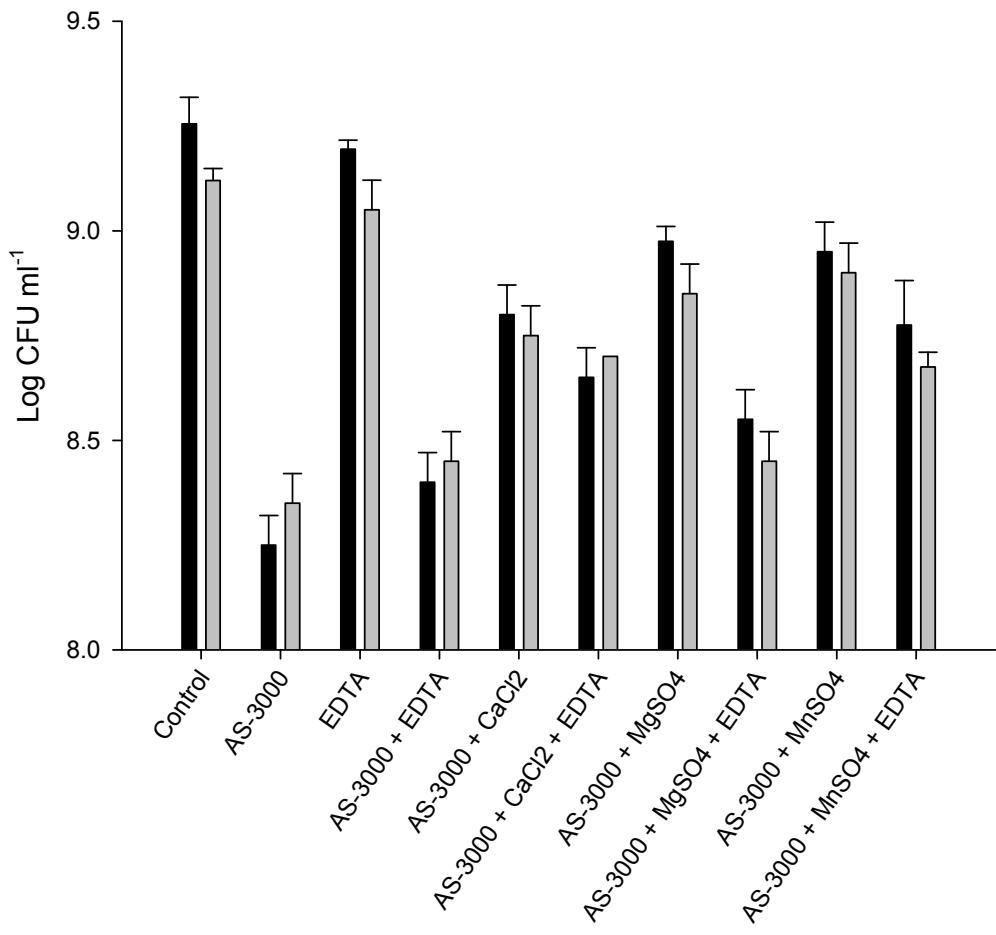


Figure 2

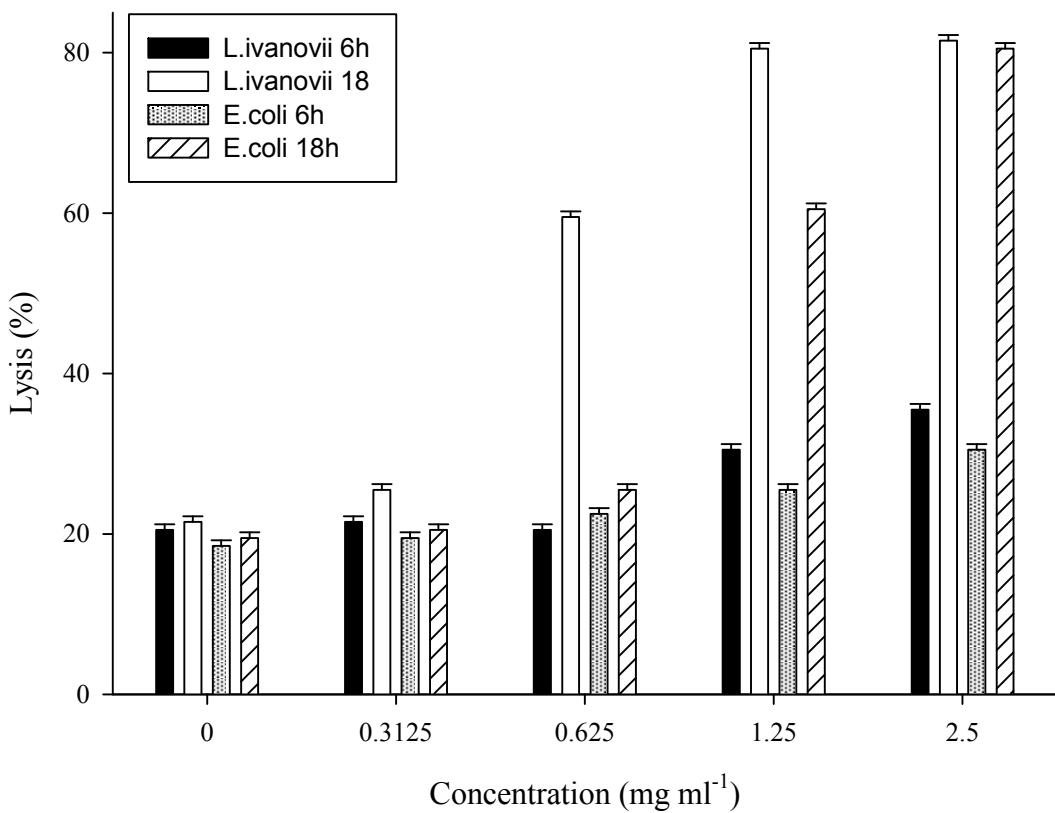


1

2 **Figure 3**

3

4



1

2 **Figure 4**

3

4

5

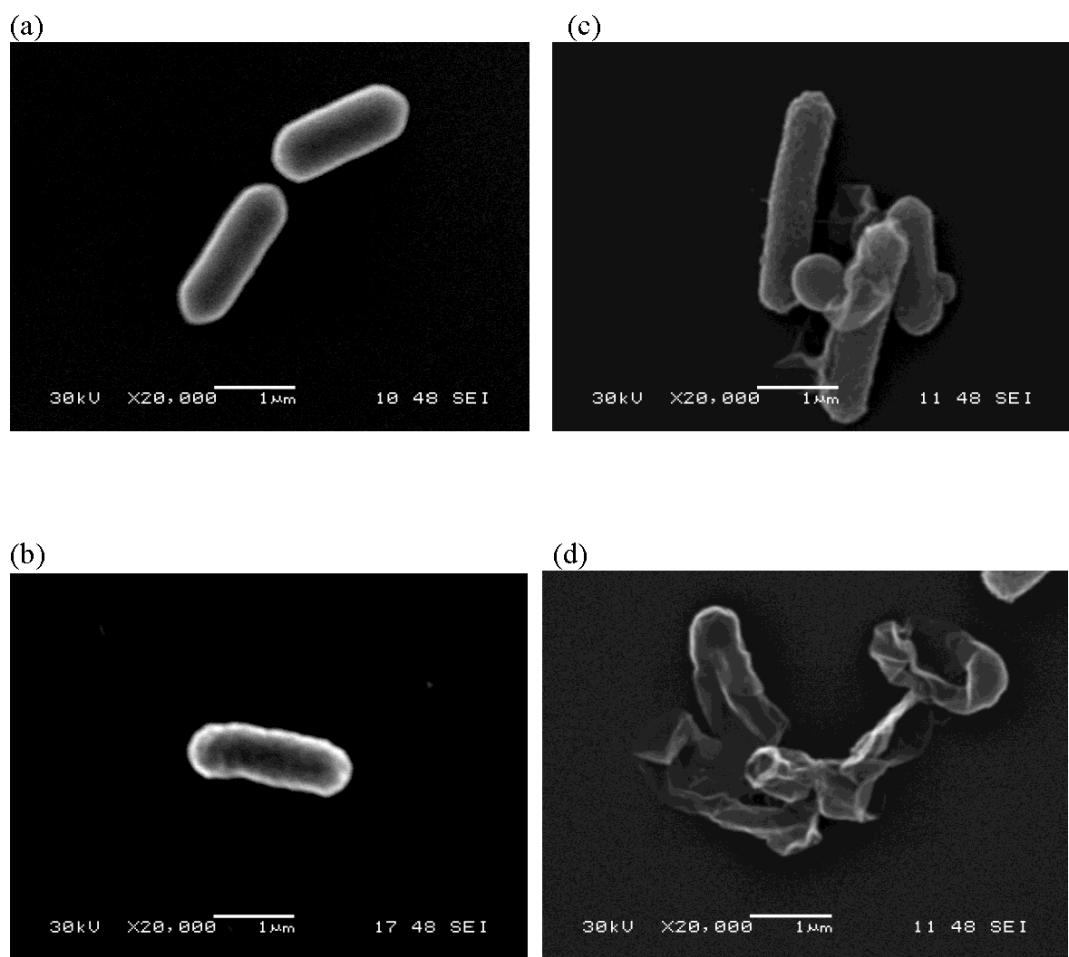


Figure 5

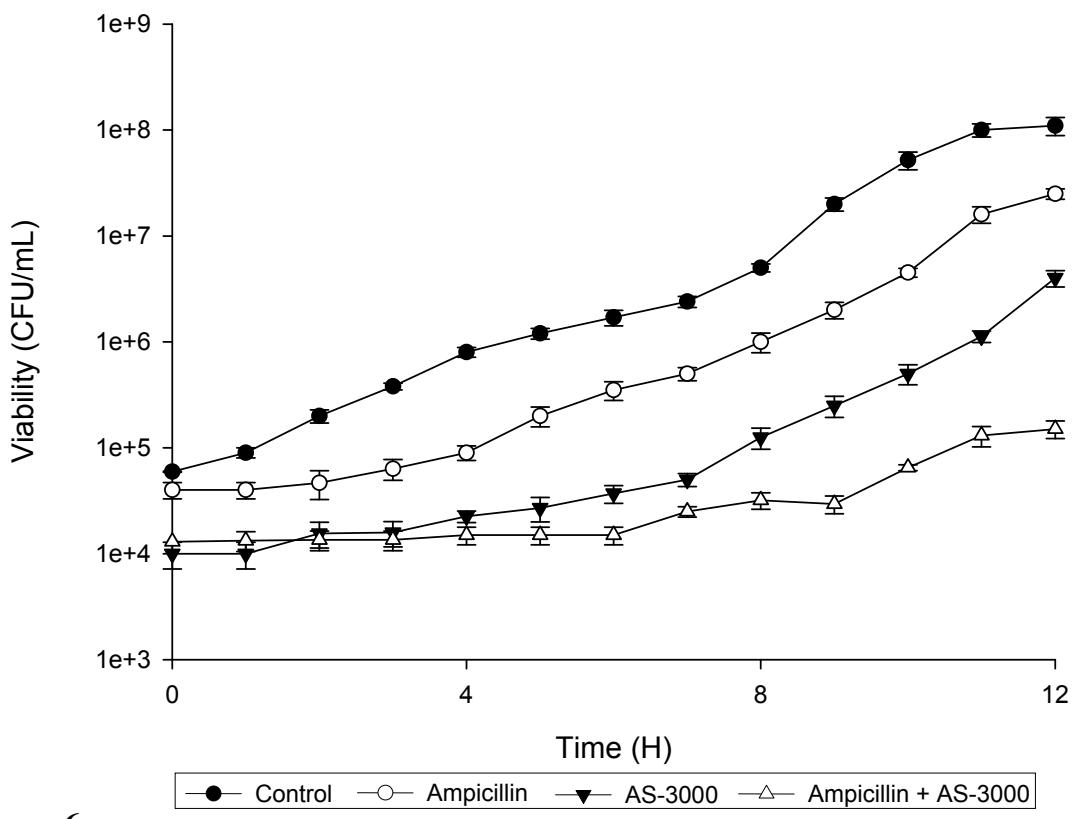


Figure 6

1 **Table 1:** Determination of MIC values of extracts of *Oudneya africana* against various
2 micro-organisms.
3

	Inhibition diameter for 2 mg (mm)	MIC (mg mL ⁻¹) AS-3000
<i>Listeria monocytogenes</i> LSD530	17.5 ± 0.71	0.156
<i>Listeria ivanovii</i> HPB28	24.0 ± 1.41	0.078
<i>Bacillus subtilis</i> PYZ9	13.0 ± 1.41	0.313
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6533	11.5 ± 0.71	0.313
<i>Enterococcus hirae</i> ATCC10541	11.0 ± 0.00	0.313
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	16.5 ± 0.71	0.156
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC19442	12.0 ± 1.41	0.313
<i>Dickeya dadantii</i> EC3937	15.0 ± 1.41	0.313
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8.5 ± 0.71	0.65
<i>Candida albicans</i>	8.5 ± 0.71	> 1.25

1 **Table 2:** Synergism rate between AS-3000 extract and antibiotics against *Listeria*
 2 *ivanovii* and *E. coli* strains.

<i>L. ivanovii</i>		MIC	MIC*	MIC _{AS-3000} *	FIC	Evaluation
Plant Extract Antibiotics (µg/mL)	AS-3000	78	-	-	-	-
	Amp*	2	0.25	38	0.61	No interaction
	Pen*	1	0.25	78	1.25	No interaction
	Van*	1	0.25	19.5	0.50	Synergy
	Chl*	16	4	19.5	0.50	Synergy
	Ery*	0.5	0.5	78	2.00	No interaction
	Gen*	1	0.5	38	0.99	No interaction
	Str*	16	4	78	1.25	No interaction
	Tet*	64	32	38	0.99	No interaction
<i>E. coli</i>		MIC	MIC*	MIC _{AS-3000} *	FIC	Evaluation
Plant Extract Antibiotics (µg/mL)	AS-3000	156	-	-	-	-
	Amp*	4	2	156	1.50	No interaction
	Pen*	0.5	0.5	78	1.50	No interaction
	Van*	4	2	156	1.50	No interaction
	Chl*	2	1	39	0.75	No interaction
	Ery*	32	32	156	2.00	No interaction
	Gen*	8	4	78	1.00	No interaction
	Str*	4	2	39	0.75	No interaction
	Tet*	2	2	78	1.50	No interaction

3
 4 Abbreviations used - MIC, minimum inhibitory concentration; MIC*, the lowest
 5 antibiotic concentration in combination with AS-3000 extract that prevented the
 6 development of turbidity (i.e., growth); MIC_{AS-3000}*: the lowest AS-3000 extract
 7 concentration in combination with antibiotic that inhibits the bacterial growth; FIC,
 8 fractional inhibitory concentration; Amp, Ampicillin; Chl, Chloramphenicol; Ery,
 9 Erythromycin; Gen, Gentamicin; Pen, Penicillin G; Str, Streptomycin; Tet,
 10 Tetracycline; Van, Vancomycin.

Conclusion générale & perspectives

L'évolution et la progression de la résistance bactérienne aux grandes classes d'antibiotiques s'avère très préoccupante en ce début de millénaire. Face à la résistance croissante des microorganismes pathogènes aux antibiotiques classiques, le contrôle des maladies infectieuses passe certainement par l'implantation de programmes de prévention efficaces mais aussi par la découverte de nouvelles armes, parmi lesquelles les « peptides antimicrobiens ». Au cours des dernières années, les peptides antimicrobiens ont fait l'objet d'attention croissante comme alternatives aux antibiotiques classiques. Ces peptides sont des molécules de faible poids moléculaire, avec généralement moins de 50 résidus d'acides aminés. Ils sont très présents chez plusieurs systèmes vivants, et représentent la première ligne de défense chez les plantes et les animaux. Il est clair, que la caractérisation de nouvelles molécules naturelles ayant des propriétés antimicrobienne, représente toujours une stratégie de découverte prometteuse et une urgence pour plusieurs secteurs. Dans cette perspective, les peptides antimicrobiens cationiques se profilent comme étant des candidats particulièrement originaux sur lesquels les efforts doivent être concentrés (Gura, 2001). À titre d'exemple, l'introduction sur le marché de végétaux à caractères nouveaux issus de la biotechnologie est une activité relativement récente dont l'impact est déjà considérable sur l'agriculture partout dans le monde. Plusieurs peptides antimicrobiens sont actuellement utilisés dans le but d'augmenter la résistance des plantes aux bactéries et champignons phytopathogènes et réduire ainsi l'utilisation de pesticides chimiques toxiques pour l'environnement. D'autre part, l'industrie pharmaceutique est maintenant mise au défi de développer des familles d'antibiotiques réellement innovantes et plusieurs peptides antimicrobiens ou dérivés sont actuellement en cours d'essais cliniques.

Plusieurs familles de peptides antimicrobiens ont été caractérisées chez les plantes. La majorité d'entre eux sont de petits peptides riches en cystéines qui forment des ponts disulfures assurant une structure spatiale globulaire. Ces molécules possèdent en général une taille variant de 2 à 9 kDa, et adoptent des structures compactes stabilisées par 2 à 6 ponts disulfures. Ces peptides sont souvent codés par des familles multigéniques dont les différents gènes présentent des particularités tissulaires d'expression. Certains gènes sont par ailleurs induits par les pathogènes, alors que d'autres sont d'expression constitutive (Broekaert *et al.*, 1995; Garcia-Olmedo *et al.*, 1998). Parmi ces peptides antimicrobiens, on distingue, entre autres, les thionines, les défensines, les LTP (Lipid Transfer Protein, Garcia-Olmedo *et al.*,

1995), les snakines (Segura *et al.*, 1999; Berrocal-Lobo *et al.*, 2002), les héveines et les knottines.

Ce travail de thèse a porté sur certains de ces peptides antimicrobiens d'origine végétale. Une approche pluridisciplinaire incluant des outils bioinformatiques et biochimiques a été utilisée pour l'étude, la caractérisation et la compréhension de la structure et de la fonctionnalité de cette catégorie prometteuse de ces peptides antimicrobiens.

Face à la grande diversité apparente des peptides antimicrobiens décrits jusqu'à présent, l'analyse bibliographique simple n'aurait pas permis d'obtenir un portrait clair sur la diversité de ce groupe de peptides ni sur leur potentiel d'utilisation. Seul un outil informatique puissant telle qu'une base de donnée interactive rapportant toute l'information pertinente sur ces peptides aurait permis une bonne exploitation des données bibliographiques. Des bases de données universelles mais non spécifiques tels que Swiss-Prot et PIR ont été déjà développées. Cependant, de telles bases ne contiennent que des informations fragmentaires et trop générales pour répondre avec précision aux attentes. L'assemblage des données concernant les peptides antimicrobiens d'origine végétale est donc une priorité de recherche qu'il faut développer. Pour assembler toutes ces informations deux étapes se sont avérées nécessaires. Lors de la première étape, nous avons développé un logiciel informatique, baptisé Scientific DataBase Maker (SciDBMaker) permettant l'extraction, l'analyse et le triage de données sur les protéines à partir de la base de données Swiss-Prot. La mise en place du logiciel SciDBMaker nous a permis d'obtenir de nombreuses informations sur les propriétés structurales des peptides notamment les séquences en acides aminés, le profil physico-chimique, la formule empirique, la masse, la taille, le point isoélectrique, la charge nette, la nature, la proportion en résidus basiques, acides, hydrophobes et polaires, l'indice d'hydrophobicité, l'indice de fixation, l'indice d'instabilité, l'indice aliphatique, le temps de demi-vie (dans les cellules mammifères, levures et *E. coli*), la richesse en certains acides aminés ciblés (cystéine, glycine...), le coefficient d'extinction, absorbance à 280 nm, etc.... Ces données ont été par la suite utilisées pour la construction d'une nouvelle base de données plus spécialisées dédiée aux peptides antimicrobiens d'origine végétale et que nous avons baptisé PhytAMP.

Cette nouvelle base de données rapporte des informations taxonomiques, microbiologiques et physico-chimiques, données importantes pour mieux étudier les peptides

antimicrobiens des plantes. La compilation de ces informations dans une ressource centralisée devrait donc faciliter l'étude de ces molécules peptidiques. PhytAMP contient des informations importantes sur 271 molécules issues de diverses familles incluant les Amaranthaceae (9), les Andropogoneae (10), les Brassicaceae (36), les Oryzeae (11), les Santalaceae (11), les Spermacoceae (17), les Triticeae (34), les Vicieae (12), et les Violaceae (51). L'analyse bioinformatique a permis de dégager les homologies de séquences et les caractéristiques structurales communes aux familles en relation avec les propriétés biologiques sur lesquelles est basée leur identification. Ainsi la constitution de cette base de données ouvre de nouvelles perspectives informatives, en particulier celles relatives à la prédiction des relations structure / fonction en relation avec les organismes cibles et donc leur mode d'action. Cette étude comparative de ces phyto-peptides antimicrobiens constitue une base de départ pour la recherche de nouvelles molécules antimicrobiennes extraites à partir des plantes.

Une approche expérimentale a été parallèlement utilisée dans le but d'évaluer le potentiel antimicrobien de certaines plantes spontanées issues des régions arides de la Tunisie ont été étudiées. Le choix de cette catégorie de plante a été dicté par la grande résistance de certaines de ces plantes aux différentes conditions de stress (biotique et abiotique) et par une volonté de préserver et de valoriser ces plantes dont les caractéristiques sont tout à fait particulières et originales. Ainsi, l'activité antimicrobienne d'*Oudneya africana* R. Br. (Brassicaceae), de *Juniperus phoenicea* L. (Cupressaceae) et de *Pistacia atlantica* Desf. (Anacardiaceae), trois espèces de plantes spontanées très utilisées en médecine traditionnelle dans les zones arides de la Tunisie, de même que leurs propriétés physico-chimiques ont été évaluées. Les résultats obtenus ont montré la présence d'une activité antimicrobienne dans les trois plantes étudiées. Cette activité vari en fonction de plusieurs paramètres notamment la nature du solvant d'extraction choisi. Cette étude comparative a établi clairement le potentiel des plantes médicinales spontanées des régions arides de la Tunisie comme source d'agents antimicrobiens. Une étude poussée a été entreprise pour étudier et caractériser en profondeur les peptides ou protéines antimicrobiens d'*Oudneya africana* R. Br. Les résultats obtenus ont montré la présence de molécule peptidique de faible masse moléculaire ayant un très large spectre d'action antimicrobien. Le mode d'action de cet extrait a été analysé ainsi que son effet synergique possible en association avec les antibiotiques. On a ainsi démontré que l'extrait peptidique d'*Oudneya* est actif contre *Listeria ivanovii*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Erwinia chrysanthemi*, *Staphylococcus aerus*, *Enterococcus hirae*,

Escherichia coli, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans*. Il est sensible aux protéases puisque le traitement de l'extrait d'*Oudneya* (AS-3000) avec la chymotrypsine et la proteinase K induit une perte importante de l'activité antimicrobienne. Des expériences de microscopie électronique à balayage ont montré clairement l'effet lytique du peptide sur les cellules de *Listeria ivanovii* et *Escherichia coli*. L'étude des effets synergiques entre les peptides isolés (extrait AS-3000) et certains antibiotiques tels que ampicilline, chloramphenicol, érythromycine, gentamicine, pénicilline G, Streptomycine, tétracycline et vancomycine a permis de calculer l'indice FIC et a permis ainsi de mettre en évidence des effets additifs qui varie selon l'antibiotique ainsi qu'un effet post-antibiotique (PAE) très significatif.

En conclusion, notre travail constitue une contribution importante à l'étude des peptides antimicrobiens d'origine végétale. Des informations scientifiques très originales ont été générées tout au long de notre étude. Ces connaissances tant fondamentales qu'appliquées ouvrent des perspectives multiples pour une exploration plus poussée de ce champ d'activité encore très peu exploité. De façon plus spécifique, les résultats obtenus relatifs à l'identification et à la caractérisation de nouveaux peptides antimicrobiens à partir d'*Oudneya africana* sont prometteurs, puisque ces nouvelles molécules végétales représentent un d'intérêt et un potentiel d'exploitation aussi bien dans le secteur agroalimentaire que pharmaceutique.

Références bibliographiques

潮湿 A 潮湿

Agerberth, B.; Charo, J.; Werr, J.; Olsson, B.; Idali, F.; Lindbom, L.; Kiessling, R.; Jornvall, H.; Wigzell, H. and Gudmundsson, G. H. "The Human Antimicrobial and Chemotactic Peptides LL-37 and Alpha-Defensins Are Expressed by Specific Lymphocyte and Monocyte Populations." *Blood*, 2000, 96(9), pp. 3086-93.

Agerberth, B.; Gunne, H.; Odeberg, J.; Kogner, P.; Boman, H. G. and Gudmundsson, G. H. "Fall-39, a Putative Human Peptide Antibiotic, Is Cysteine-Free and Expressed in Bone Marrow and Testis." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(1), pp. 195-9.

Agerberth, B.; Lee, J. Y.; Bergman, T.; Carlquist, M.; Boman, H. G.; Mutt, V. and Jornvall, H. "Amino Acid Sequence of Pr-39. Isolation from Pig Intestine of a New Member of the Family of Proline-Arginine-Rich Antibacterial Peptides." *Eur J Biochem*, 1991, 202(3), pp. 849-54.

Agrios, G.N. *How Plants Defend Themselves against Pathogens*. Elsevier, 2005.

Albiol-Matanic, V. C. and Castilla, V. "Antiviral Activity of Antimicrobial Cationic Peptides against Junin Virus and Herpes Simplex Virus." *Int J Antimicrob Agents*, 2004, 23(4), pp. 382-9.

Almeida, M. S.; Cabral, K. M.; Kurtenbach, E.; Almeida, F. C. and Valente, A. P. "Solution Structure of Pisum Sativum Defensin 1 by High Resolution Nmr: Plant Defensins, Identical Backbone with Different Mechanisms of Action." *J Mol Biol*, 2002, 315(4), pp. 749-57.

Altschul, SF; Madden, TL; Schaffer, AA; Zhang, J; Zhang, Z; Miller, W and Lipman, DJ. "Gapped Blast and Psi-Blast: A New Generation of Protein Database Search Programs." *Nucleic Acids Res*, 1997, 25, pp. 3389 - 402.

Andres, E. and Dimarcq, J. L. "Cationic Antimicrobial Peptides: Update of Clinical Development." *J Intern Med*, 2004, 255(4), pp. 519-20.

Apweiler, R; Bairoch, A and Wu, HC. "The Universal Protein Resource (Uniprot) Protein Sequence Databases." *Nucleic Acids Res*, 2007, 35, pp. D193 - D97.

潮湿 B 潮湿

Bachmair, A; Finley, D and Varshavsky, A. "In Vivo Half-Life of a Protein Is a Function of Its Amino-Terminal Residue." *Science*, 1986, 234, pp. 179 - 86.

Balls, A.K., Hale, W.S. and Harris, T.H. "A Crystalline Protein Obtained from a Lipoprotein of Wheat Flour." *Cereal Chem.*, 1942, 19, pp. 279-88.

Bellm, L.; Lehrer, R. I. and Ganz, T. "Protegrins: New Antibiotics of Mammalian Origin." *Expert Opin Investig Drugs*, 2000, 9(8), pp. 1731-42.

Berrocal-Lobo, M.; Segura, A.; Moreno, M.; Lopez, G.; Garcia-Olmedo, F. and Molina, A. "Snakin-2, an Antimicrobial Peptide from Potato Whose Gene Is Locally Induced by

Wounding and Responds to Pathogen Infection." *Plant Physiol.*, 2002, 128(3), pp. 951-61.

Bjellqvist, B; Basse, B; Olsen, E and Celis, JE. "Reference Points for Comparisons of Two-Dimensional Maps of Proteins from Different Human Cell Types Defined in a Ph Scale Where Isoelectric Points Correlate with Polypeptide Compositions." *Electrophoresis*, 1994, 15, pp. 529 - 39.

Boeckmann, B; Bairoch, A; Apweiler, R; Blatter, MC; Estreicher, A; Gasteiger, E; Martin, MJ; Michoud, K; O'Donovan, C; Phan, I, et al. "The Swiss-Prot Protein Knowledgebase and Its Supplement Trembl in 2003." *Nucleic Acids Res.*, 2003, 31, pp. 365 - 70.

Bohlmann, H and Apel, K. "Thionins." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1991, 42(1), pp. 227-40.

Bohlmann, H.; Clausen, S.; Behnke, S.; Giese, H.; Hiller, C.; Reimann-Philipp, U.; Schrader, G.; Barkholt, V. and Apel, K. "Leaf-Specific Thionins of Barley-a Novel Class of Cell Wall Proteins Toxic to Plant-Pathogenic Fungi and Possibly Involved in the Defence Mechanism of Plants." *EMBO J.*, 1988, 7(6), pp. 1559-65.

Boman, H. G. "Gene-Encoded Peptide Antibiotics and the Concept of Innate Immunity: An Update Review." *Scand J Immunol.*, 1998, 48(1), pp. 15-25.

Bradford, M. M. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Anal Biochem*, 1976, 72, pp. 248-54.

Broekaert, W. F.; Cammue, B. P. A.; De Bolle, M. F. C.; Thevissen, K.; De Samblanx, G. W. and Osborn, R. W. "Antimicrobial Peptides from Plants." *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1997, 16(3), pp. 297 - 323.

Broekaert, W. F.; Terras, F. R.; Cammue, B. P. and Osborn, R. W. "Plant Defensins: Novel Antimicrobial Peptides as Components of the Host Defense System." *Plant Physiol.*, 1995, 108(4), pp. 1353-8.

Brogden, K. A. "Antimicrobial Peptides: Pore Formers or Metabolic Inhibitors in Bacteria?" *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3(3), pp. 238-50.

Bulet, Phillippe; Hetru, Charles; Dimarcq, Jean-Luc and Hoffmann, Danièle. "Antimicrobial Peptides in Insects; Structure and Function." *Developmental & Comparative Immunology*, 1999, 23(4-5), pp. 329-44.



Cammers-Goodwin, A.; Allen, T.J.; Oslick, S.L.; McClure, K.F.; Lee, J.H. and Kemp, D.S. "Mechanism of Stabilization of Helical Conformations of Polypeptides by Water Containing Trifluoroethanol." *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118(13), pp. 3082-90.

Charvolin, D.; Douliez, J. P.; Marion, D.; Cohen-Addad, C. and Pebay-Peyroula, E. "The Crystal Structure of a Wheat Nonspecific Lipid Transfer Protein (Ns-Ltp1) Complexed with Two Molecules of Phospholipid at 2.1 Å Resolution." *Eur J Biochem*, 1999, 264(2), pp. 562-8.

Clore, G. M.; Nilges, M.; Sukumaran, D. K.; Brunger, A. T.; Karplus, M. and

Gronenborn, A. M. "The Three-Dimensional Structure of Alpha1-Purothionin in Solution: Combined Use of Nuclear Magnetic Resonance, Distance Geometry and Restrained Molecular Dynamics." *EMBO J*, 1986, 5(10), pp. 2729-35.

Colilla, F. J.; Rocher, A. and Mendez, E. "Gamma-Purothionins: Amino Acid Sequence of Two Polypeptides of a New Family of Thionins from Wheat Endosperm." *FEBS Lett*, 1990, 270(1-2), pp. 191-4.

Cornet, B.; Bonmatin, J. M.; Hetru, C.; Hoffmann, J. A.; Ptak, M. and Vovelle, F. "Refined Three-Dimensional Solution Structure of Insect Defensin A." *Structure*, 1995, 3(5), pp. 435-48.

Craig, W.A. and Gudmundsson, S. *Postantibiotic Effect. In Antibiotics in Laboratory Medicine*. New York: The Williams & Wilkins Co., 1996.

Cross, T. A. "Solid-State Nuclear Magnetic Resonance Characterization of Gramicidin Channel Structure." *Methods Enzymol*, 1997, 289, pp. 672-96.

❖ D ❖

de Vos, W. M.; Mulders, J. W.; Siezen, R. J.; Hugenholtz, J. and Kuipers, O. P. "Properties of Nisin Z and Distribution of Its Gene, Nisz, in Lactococcus Lactis." *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(1), pp. 213-8.

Destoumieux, D.; Bulet, P.; Strub, J. M.; Van Dorsselaer, A. and Bachere, E. "Recombinant Expression and Range of Activity of Penaeidins, Antimicrobial Peptides from Penaeid Shrimp." *Eur J Biochem*, 1999, 266(2), pp. 335-46.

Destoumieux, D.; Munoz, M.; Bulet, P. and Bachere, E. "Penaeidins, a Family of Antimicrobial Peptides from Penaeid Shrimp (Crustacea, Decapoda)." *Cell Mol Life Sci*, 2000, 57(8-9), pp. 1260-71.

Dieryck, W.; Gautier, M. F.; Lullien, V. and Joudrier, P. "Nucleotide Sequence of a Cdna Encoding a Lipid Transfer Protein from Wheat (*Triticum Durum Desf.*)." *Plant Mol Biol*, 1992, 19(4), pp. 707-9.

Dimopoulos, G.; Richman, A.; Muller, H. M. and Kafatos, F. C. "Molecular Immune Responses of the Mosquito *Anopheles Gambiae* to Bacteria and Malaria Parasites." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(21), pp. 11508-13.

Douliez, J. P.; Pato, C.; Rabesona, H.; Molle, D. and Marion, D. "Disulfide Bond Assignment, Lipid Transfer Activity and Secondary Structure of a 7-Kda Plant Lipid Transfer Protein, Ltp2." *Eur J Biochem*, 2001, 268(5), pp. 1400-3.

Duvick, J. P.; Rood, T.; Rao, A. G. and Marshak, D. R. "Purification and Characterization of a Novel Antimicrobial Peptide from Maize (*Zea Mays L.*) Kernels." *J Biol Chem*, 1992, 267(26), pp. 18814-20.

❖ E ❖

Ehrenstein, G. and Lecar, H. "Electrically Gated Ionic Channels in Lipid Bilayers." *Q Rev*

Biophys, 1977, 10(1), pp. 1-34.

Ehret-Sabatier, L.; Loew, D.; Goyffon, M.; Fehlbaum, P.; Hoffmann, J. A.; van Dorsselaer, A. and Bulet, P. "Characterization of Novel Cysteine-Rich Antimicrobial Peptides from Scorpion Blood." *J Biol Chem*, 1996, 271(47), pp. 29537-44.

Eisenhauer, P. B.; Harwig, S. S. and Lehrer, R. I. "Cryptdins: Antimicrobial Defensins of the Murine Small Intestine." *Infect Immun*, 1992, 60(9), pp. 3556-65.

Epand, R. M. and Vogel, H. J. "Diversity of Antimicrobial Peptides and Their Mechanisms of Action." *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1462(1-2), pp. 11-28.

Epple, P.; Apel, K. and Bohlmann, H. "An *Arabidopsis Thaliana* Thionin Gene Is Inducible Via a Signal Transduction Pathway Different from That for Pathogenesis-Related Proteins." *Plant Physiol*, 1995, 109(3), pp. 813-20.

3 F 3

Fant, F.; Vranken, W.; Broekaert, W. and Borremans, F. "Determination of the Three-Dimensional Solution Structure of *Raphanus Sativus* Antifungal Protein 1 by ¹H Nmr." *J Mol Biol*, 1998, 279(1), pp. 257-70.

Florack, D. E. and Stiekema, W. J. "Thionins: Properties, Possible Biological Roles and Mechanisms of Action." *Plant Mol Biol*, 1994, 26(1), pp. 25-37.

Franklin, J. C.; Ellena, J. F.; Jayasinghe, S.; Kelsh, L. P. and Cafiso, D. S. "Structure of Micelle-Associated Alamethicin from ¹H Nmr. Evidence for Conformational Heterogeneity in a Voltage-Gated Peptide." *Biochemistry*, 1994, 33(13), pp. 4036-45.

Fregeau Gallagher, N. L.; Sailer, M.; Niemczura, W. P.; Nakashima, T. T.; Stiles, M. E. and Vedera, J. C. "Three-Dimensional Structure of Leucocin a in Trifluoroethanol and Dodecylphosphocholine Micelles: Spatial Location of Residues Critical for Biological Activity in Type Iia Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria." *Biochemistry*, 1997, 36(49), pp. 15062-72.

Fujimura, M.; Minami, Y.; Watanabe, K. and Tadera, K. "Purification, Characterization, and Sequencing of a Novel Type of Antimicrobial Peptides, Fa-Amp1 and Fa-Amp2, from Seeds of Buckwheat (*Fagopyrum Esculentum* Moench.)." *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, 67(8), pp. 1636-42.

3 G 3

Ganz, T. and Lehrer, R. I. "Antimicrobial Peptides of Vertebrates." *Curr Opin Immunol*, 1998, 10(1), pp. 41-4.

Ganz, T.; Selsted, M. E.; Szklarek, D.; Harwig, S. S.; Daher, K.; Bainton, D. F. and Lehrer, R. I. "Defensins. Natural Peptide Antibiotics of Human Neutrophils." *J Clin Invest*, 1985, 76(4), pp. 1427-35.

Garcia-Olmedo, F.; Molina, A.; Alamillo, J. M. and Rodriguez-Palenzuela, P. "Plant Defense Peptides." *Biopolymers*, 1998, 47(6), pp. 479-91.

- Garcia-Olmedo, F.; Molina, A.; Segura, A. and Moreno, M.** "The Defensive Role of Nonspecific Lipid-Transfer Proteins in Plants." *Trends Microbiol.*, 1995, 3(2), pp. 72-4.
- Garcia-Olmedo, F.; Rodriguez-Palenzuela, P.; Hernandez Lucas, C.; Ponz, F.; Marana, C.; Carmona, M.J.; Lopez Fando, J.J.; Fernandez, J.A. and Carbonero, P.** "The Thionins : A Protein Family That Includes Purothionins, Viscotoxins and Crambin." *Oxford Surv. Plant Mol. Cell Biol.*, 1989, 6, pp. 31-60.
- Gartia, A.** "Sur Un Remarquable Exemple D'antagonisme Entre Deux Souches De Colibacille." *Compt rend soc biol*, 1925, 93, pp. 1040-41.
- Gausing, K.** "Thionin Genes Specifically Expressed in Barley Leaves." *Planta*, 1987, 171(2), pp. 241-46.
- Gennaro, R.; Skerlavaj, B. and Romeo, D.** "Purification, Composition, and Activity of Two Bactenecins, Antibacterial Peptides of Bovine Neutrophils." *Infect Immun*, 1989, 57(10), pp. 3142-6.
- Gincel, E.; Simorre, J. P.; Caille, A.; Marion, D.; Ptak, M. and Vovelle, F.** "Three-Dimensional Structure in Solution of a Wheat Lipid-Transfer Protein from Multidimensional 1h-Nmr Data. A New Folding for Lipid Carriers." *Eur J Biochem*, 1994, 226(2), pp. 413-22.
- Gomes, E.; Sagot, E.; Gaillard, C.; Laquitaine, L.; Poinsot, B.; Sanejouand, Y. H.; Delrot, S. and Coutos-Thevenot, P.** "Nonspecific Lipid-Transfer Protein Genes Expression in Grape (Vitis Sp.) Cells in Response to Fungal Elicitor Treatments." *Mol Plant Microbe Interact*, 2003, 16(5), pp. 456-64.
- Gonda, DK; Bachmair, A; Wunning, I; Tobias, JW; Lane, WS and Varshavsky, AJ.** "Universality and Structure of the N-End Rule." *J Biol Chem*, 1989, 264, pp. 16700 - 12.
- Gran, L.** "On the Effect of a Polypeptide Isolated From "Kalata-Kalata" (Oldenlandia Affinis Dc) on the Oestrogen Dominated Uterus." *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*, 1973, 33(5), pp. 400-8.
- Gura, T.** "Innate Immunity. Ancient System Gets New Respect." *Science*, 2001, 291(5511), pp. 2068-71.
- Guruprasad, K; Reddy, BVB and Pandit, MW.** "Correlation between Stability of a Protein and Its Dipeptide Composition: A Novel Approach for Predicting in Vivo Stability of a Protein from Its Primary Sequence." *Protein Eng*, 1990, 4, pp. 155 - 61.
- Gustafson, Kirk R.; Sowder, Raymond C.; Henderson, Louis E.; Parsons, Ian C.; Kashman, Yoel; Cardellina, John H.; McMahon, James B.; Buckheit, Robert W.; Pannell, Lewis K. and Boyd, Michael R.** "Circulins a and B. Novel Human Immunodeficiency Virus (Hiv)-Inhibitory Macroyclic Peptides from the Tropical Tree Chassalia Parvifolia." *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116(20), pp. 9337-38.

潮湿

Hallock, K. J.; Lee, D. K. and Ramamoorthy, A. "Msi-78, an Analogue of the Magainin Antimicrobial Peptides, Disrupts Lipid Bilayer Structure Via Positive Curvature Strain." *Biophys J*, 2003, 84(5), pp. 3052-60.

Hammami, R.; Zouhir, A.; Ben Hamida, J. and Fliss, I. "BACTIBASE: A New Web-

Accessible Database for Bacteriocin Characterization." *BMC Microbiol*, 2007, 7, pp. 89.

Hammami, Riadh; Zouhir, Abdelmajid; Naghmouchi, Karim; Ben Hamida, Jeannette and Fliss, Ismail. "Scidbmaker: New Software for Computer-Aided Design of Specialized Biological Databases." *BMC Bioinformatics*, 2008, 9(1), pp. 121.

Hancock, R. E. "Cationic Antimicrobial Peptides: Towards Clinical Applications." *Expert Opin Investig Drugs*, 2000, 9(8), pp. 1723-9.

Harwig, S. S.; Kokryakov, V. N.; Swiderek, K. M.; Aleshina, G. M.; Zhao, C. and Lehrer, R. I. "Prophenin-1, an Exceptionally Proline-Rich Antimicrobial Peptide from Porcine Leukocytes." *FEBS Lett*, 1995, 362(1), pp. 65-9.

He, K.; Ludtke, S. J.; Worcester, D. L. and Huang, H. W. "Neutron Scattering in the Plane of Membranes: Structure of Alamethicin Pores." *Biophys J*, 1996, 70(6), pp. 2659-66.

Heinemann, B.; Andersen, K. V.; Nielsen, P. R.; Bech, L. M. and Poulsen, F. M. "Structure in Solution of a Four-Helix Lipid Binding Protein." *Protein Sci*, 1996, 5(1), pp. 13-23.

Hendrickson, Wayne A. and Teeter, Martha M. "Structure of the Hydrophobic Protein Crambin Determined Directly from the Anomalous Scattering of Sulphur." *Nature*, 1981, 290(5802), pp. 107-13.

Henryk, M; Russell, MC and Randolph, VL. "Statistical Determination of the Average Values of the Extinction Coefficients of Tryptophan and Tyrosine in Native Proteins." *Anal Biochem*, 1992, 200, pp. 74 - 80.

Hirsch, A. "Growth and Nisin Production of a Strain of *Streptococcus Lactis*." *J Gen Microbiol*, 1951, 5(1), pp. 208-21.

Hoffmann, J. A. and Hetru, C. "Insect Defensins: Inducible Antibacterial Peptides." *Immunol Today*, 1992, 13(10), pp. 411-5.

Hoffmann, J. A.; Kafatos, F. C.; Janeway, C. A. and Ezekowitz, R. A. "Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity." *Science*, 1999, 284(5418), pp. 1313-8.

Holak, Tadeusz A.; Engstroem, Aake; Kraulis, Per J.; Lindeberg, Gunnar; Bennich, Hans; Jones, T. Alwyn; Gronenborn, Angela M. and Clore, G. Marius. "The Solution Conformation of the Antibacterial Peptide Cecropin A: A Nuclear Magnetic Resonance and Dynamical Simulated Annealing Study." *Biochemistry*, 1988, 27(20), pp. 7620-29.

Huang, R. H.; Xiang, Y.; Liu, X. Z.; Zhang, Y.; Hu, Z. and Wang, D. C. "Two Novel Antifungal Peptides Distinct with a Five-Disulfide Motif from the Bark of *Eucommia Ulmoides Oliv.*" *FEBS Lett*, 2002, 521(1-3), pp. 87-90.

Hwang, P. M.; Zhou, N.; Shan, X.; Arrowsmith, C. H. and Vogel, H. J. "Three-Dimensional Solution Structure of Lactoferricin B, an Antimicrobial Peptide Derived from Bovine Lactoferrin." *Biochemistry*, 1998, 37(12), pp. 4288-98.



Ikai, AJ. "Thermostability and Aliphatic Index of Globular Proteins." *J Biochem*, 1980, 88, pp. 1895 - 98.

ꝝ J ☽

Jack, K and Russell, FD. "A Simple Method for Displaying the Hydropathic Character of a Protein." *J Mol Biol*, 1982, 157, pp. 105 - 32.

Jacob, F.; Lwoff, A.; Siminovitch, A. and Wollman, E. "[Definition of Some Terms Relative to Lysogeny]." *Ann Inst Pasteur (Paris)*, 1953, 84(1), pp. 222-4.

Jacob, L. and Zasloff, M. "Potential Therapeutic Applications of Magainins and Other Antimicrobial Agents of Animal Origin." *Ciba Found Symp*, 1994, 186, pp. 197-216; discussion 16-23.

James, S.; Gibbs, B. F.; Toney, K. and Bennett, H. P. "Purification of Antimicrobial Peptides from an Extract of the Skin of *Xenopus Laevis* Using Heparin-Affinity Hplc: Characterization by Ion-Spray Mass Spectrometry." *Anal Biochem*, 1994, 217(1), pp. 84-90.

Janssen, B. J.; Schirra, H. J.; Lay, F. T.; Anderson, M. A. and Craik, D. J. "Structure of Petunia Hybrida Defensin 1, a Novel Plant Defensin with Five Disulfide Bonds." *Biochemistry*, 2003, 42(27), pp. 8214-22.

Jennings, C.; West, J.; Waine, C.; Craik, D. and Anderson, M. "Biosynthesis and Insecticidal Properties of Plant Cyclotides: The Cyclic Knotted Proteins from Oldenlandia Affinis." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(19), pp. 10614-9.

ꝝ K ☽

Kader, J. C. "Lipid-Transfer Proteins in Plants." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1996, 47, pp. 627-54.

Kader J.C. "Proteins and the Intracellular Exchange of Lipids. I. Stimulation of Phospholipid Exchange between Mitochondria and Microsomal Fractions by Proteins Isolated from Potato Tuber." *Biochim Biophys Acta*, 1975, 380(1), pp. 31-44.

Kawano, K.; Yoneya, T.; Miyata, T.; Yoshikawa, K.; Tokunaga, F.; Terada, Y. and Iwanaga, S. "Antimicrobial Peptide, Tachyplesin I, Isolated from Hemocytes of the Horseshoe Crab (*Tachypleus Tridentatus*). Nmr Determination of the Beta-Sheet Structure." *J Biol Chem*, 1990, 265(26), pp. 15365-7.

Kazan, Kemal; Rusu, Anca; Marcus, John P.; Goulter, Ken C. and Manners, John M. "Enhanced Quantitative Resistance to Leptosphaeria Maculans Conferred by Expression of a Novel Antimicrobial Peptide in Canola (*Brassica Napus L.*)." *Molecular Breeding*, 2002, 10(1), pp. 63-70.

Ketchem, R. R.; Hu, W. and Cross, T. A. "High-Resolution Conformation of Gramicidin a in a Lipid Bilayer by Solid-State Nmr." *Science*, 1993, 261(5127), pp. 1457-60.

Kobayashi, Y.; Takashima, H.; Tamaoki, H.; Kyogoku, Y.; Lambert, P.; Kuroda, H.; Chino, N.; Watanabe, T. X.; Kimura, T.; Sakakibara, S., et al. "The Cystine-Stabilized Alpha-Helix: A Common Structural Motif of Ion-Channel Blocking Neurotoxic Peptides." *Biopolymers*, 1991, 31(10), pp. 1213-20.

Koo, J. C.; Lee, S. Y.; Chun, H. J.; Cheong, Y. H.; Choi, J. S.; Kawabata, S.; Miyagi, M.; Tsunasawa, S.; Ha, K. S.; Bae, D. W., et al. "Two Hevein Homologs Isolated from the

Seed of Pharbitis Nil L. Exhibit Potent Antifungal Activity." *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1382(1), pp. 80-90.

Krajewski, K.; Marchand, C.; Long, Y. Q.; Pommier, Y. and Roller, P. P. "Synthesis and Hiv-1 Integrase Inhibitory Activity of Dimeric and Tetrameric Analogs of Indolicidin." *Bioorg Med Chem Lett*, 2004, 14(22), pp. 5595-8.

3 L 3

Labarga, A; Valentin, F; Andersson, M and Lopez, R. "Web Services at the European Bioinformatics Institute." *Nucleic Acids Res*, 2007, (35 Web Server), pp. W6 - 11.

Ladokhin, A. S.; Selsted, M. E. and White, S. H. "Bilayer Interactions of Indolicidin, a Small Antimicrobial Peptide Rich in Tryptophan, Proline, and Basic Amino Acids." *Biophys J*, 1997, 72(2 Pt 1), pp. 794-805.

Lamb, H. M. and Wiseman, L. R. "Pexiganan Acetate." *Drugs*, 1998, 56(6), pp. 1047-52; discussion 53-4.

Lambert, J; E, Keppi; J, L Dimarcq; C, Wicker; J, M Reichhart; B, Dunbar; P, Lepage; A, Van Dorsselaer; J, Hoffmann and J, Fothergill. "Insect Immunity: Isolation from Immune Blood of the Dipteron Phormia Terranova of Two Insect Antibacterial Peptides with Sequence Homology to Rabbit Lung Macrophage Bactericidal Peptides." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86(1), pp. 262-66.

Landon, C.; Sodano, P.; Hetru, C.; Hoffmann, J. and Ptak, M. "Solution Structure of Drosomycin, the First Inducible Antifungal Protein from Insects." *Protein Sci*, 1997, 6(9), pp. 1878-84.

Larkin, MA; Blackshields, G; Brown, NP; Chenna, R; McGettigan, PA; McWilliam, H; Valentin, F; Wallace, IM; Wilm, A; Lopez, R, et al. "Clustalw and Clustalx Version 2.0." *Bioinformatics*, 2007, 23(21), pp. 2947 - 48.

Lawyer, C.; Pai, S.; Watabe, M.; Borgia, P.; Mashimo, T.; Eagleton, L. and Watabe, K. "Antimicrobial Activity of a 13 Amino Acid Tryptophan-Rich Peptide Derived from a Putative Porcine Precursor Protein of a Novel Family of Antibacterial Peptides." *FEBS Letters*, 1996, 390(1), pp. 95-98.

Lay, F. T.; Schirra, H. J.; Scanlon, M. J.; Anderson, M. A. and Craik, D. J. "The Three-Dimensional Solution Structure of Nad1, a New Floral Defensin from Nicotiana Alata and Its Application to a Homology Model of the Crop Defense Protein Alfafp." *J Mol Biol*, 2003, 325(1), pp. 175-88.

Lee, J. Y.; Boman, A.; Sun, C. X.; Andersson, M.; Jornvall, H.; Mutt, V. and Boman, H. G. "Antibacterial Peptides from Pig Intestine: Isolation of a Mammalian Cecropin." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86(23), pp. 9159-62.

Lee, J. Y.; Min, K.; Cha, H.; Shin, D. H.; Hwang, K. Y. and Suh, S. W. "Rice Non-Specific Lipid Transfer Protein: The 1.6 Å Crystal Structure in the Unliganded State Reveals a Small Hydrophobic Cavity." *J Mol Biol*, 1998, 276(2), pp. 437-48.

Lehrer, R. I. and Ganz, T. "Antimicrobial Peptides in Mammalian and Insect Host Defence." *Curr Opin Immunol*, 1999, 11(1), pp. 23-7.

Lehrer, R. I. and Ganz, T. "Endogenous Vertebrate Antibiotics. Defensins, Protegrins, and Other Cysteine-Rich Antimicrobial Peptides." *Ann N Y Acad Sci*, 1996, 797, pp. 228-39.

Liu, Y. J.; Samuel, D.; Lin, C. H. and Lyu, P. C. "Purification and Characterization of a Novel 7-Kda Non-Specific Lipid Transfer Protein-2 from Rice (*Oryza Sativa*)."
Biochem Biophys Res Commun, 2002, 294(3), pp. 535-40.

潮湿 M 潮湿

Mackay, M. L.; Milne, K. and Gould, I. M. "Comparison of Methods for Assessing Synergic Antibiotic Interactions."
Int J Antimicrob Agents, 2000, 15(2), pp. 125-9.

Marcus, J. P.; Goulter, K. C.; Green, J. L.; Harrison, S. J. and Manners, J. M. "Purification, Characterisation and Cdna Cloning of an Antimicrobial Peptide from Macadamia Integrifolia."
Eur J Biochem, 1997, 244(3), pp. 743-9.

Marcus, J. P.; Green, J. L.; Goulter, K. C. and Manners, J. M. "A Family of Antimicrobial Peptides Is Produced by Processing of a 7s Globulin Protein in Macadamia Integrifolia Kernels."
Plant J, 1999, 19(6), pp. 699-710.

Marion, D.; Zasloff, M. and Bax, A. "A Two-Dimensional Nmr Study of the Antimicrobial Peptide Magainin 2."
FEBS Lett, 1988, 227(1), pp. 21-6.

Matsuyama, K. and Natori, S. "Purification of Three Antibacterial Proteins from the Culture Medium of Nih-Sape-4, an Embryonic Cell Line of *Sarcophaga Peregrina*.
J Biol Chem, 1988, 263(32), pp. 17112-6.

Matsuzaki, K.; Murase, O.; Fujii, N. and Miyajima, K. "An Antimicrobial Peptide, Magainin 2, Induced Rapid Flip-Flop of Phospholipids Coupled with Pore Formation and Peptide Translocation."
Biochemistry, 1996, 35(35), pp. 11361-8.

McDonald, N. Q. and Hendrickson, W. A. "A Structural Superfamily of Growth Factors Containing a Cystine Knot Motif."
Cell, 1993, 73(3), pp. 421-4.

McManus, A. M.; Nielsen, K. J.; Marcus, J. P.; Harrison, S. J.; Green, J. L.; Manners, J. M. and Craik, D. J. "Miamp1, a Novel Protein from Macadamia Integrifolia Adopts a Greek Key Beta-Barrel Fold Unique Amongst Plant Antimicrobial Proteins."
J Mol Biol, 1999, 293(3), pp. 629-38.

Mendez, E.; Moreno, A.; Colilla, F.; Pelaez, F.; Limas, G. G.; Mendez, R.; Soriano, F.; Salinas, M. and de Haro, C. "Primary Structure and Inhibition of Protein Synthesis in Eukaryotic Cell-Free System of a Novel Thionin, Gamma-Hordothionin, from Barley Endosperm."
Eur J Biochem, 1990, 194(2), pp. 533-9.

Mikloska, Z. and Cunningham, A. L. "Alpha and Gamma Interferons Inhibit Herpes Simplex Virus Type 1 Infection and Spread in Epidermal Cells after Axonal Transmission."
J Virol, 2001, 75(23), pp. 11821-6.

Montesinos, E. "Antimicrobial Peptides and Plant Disease Control."
FEMS Microbiol Lett, 2007, 270(1), pp. 1-11.

Murakami, T.; Nakajima, T.; Koyanagi, Y.; Tachibana, K.; Fujii, N.; Tamamura, H.; Yoshida, N.; Waki, M.; Matsumoto, A.; Yoshie, O., et al. "A Small Molecule Cxcr4 Inhibitor That Blocks T Cell Line-Tropic Hiv-1 Infection."
J Exp Med, 1997, 186(8), pp.

1389-93.

Murakami, T.; Niwa, M.; Tokunaga, F.; Miyata, T. and Iwanaga, S. "Direct Virus Inactivation of Tachyplesin I and Its Isopeptides from Horseshoe Crab Hemocytes." *Chemotherapy*, 1991, 37(5), pp. 327-34.

Muroi, H. and Kubo, I. "Antibacterial Activity of Anacardic Acid and Totarol, Alone and in Combination with Methicillin, against Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus." *J Appl Bacteriol*, 1996, 80(4), pp. 387-94.

☞ N ☞

Nedoma, K.; Mellan, J.; Pondelickova, J. and Loschner, J. "[Epidemiology of Pedophilic Sexual Delinquency]." *Cesk Psychiatr*, 1968, 64(6), pp. 392-6.

Normark, B. H. and Normark, S. "Evolution and Spread of Antibiotic Resistance." *J Intern Med*, 2002, 252(2), pp. 91-106.

North, C. L.; Barranger-Mathys, M. and Cafiso, D. S. "Membrane Orientation of the N-Terminal Segment of Alamethicin Determined by Solid-State ^{15}N Nmr." *Biophys J*, 1995, 69(6), pp. 2392-7.

☞ O ☞

Orivel, J.; Redeker, V.; Le Caer, J. P.; Krier, F.; Revol-Junelles, A. M.; Longeon, A.; Chaffotte, A.; Dejean, A. and Rossier, J. "Ponericins, New Antibacterial and Insecticidal Peptides from the Venom of the Ant *Pachycondyla Goeldii*." *J Biol Chem*, 2001, 276(21), pp. 17823-9.

Osborn, R. W.; De Samblanx, G. W.; Thevissen, K.; Goderis, I.; Torrekens, S.; Van Leuven, F.; Attenborough, S.; Rees, S. B. and Broekaert, W. F. "Isolation and Characterisation of Plant Defensins from Seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae." *FEBS Lett*, 1995, 368(2), pp. 257-62.

Ouellette, A. J. and Bevins, C. L. "Paneth Cell Defensins and Innate Immunity of the Small Bowel." *Inflamm Bowel Dis*, 2001, 7(1), pp. 43-50.

☞ P ☞

Page, RDM. "Treeview: An Application to Display Phylogenetic Trees on Personal Computers." *CABIOS*, 1996, 12, pp. 357 - 58.

Pallaghy, P. K.; Nielsen, K. J.; Craik, D. J. and Norton, R. S. "A Common Structural Motif Incorporating a Cystine Knot and a Triple-Stranded Beta-Sheet in Toxic and Inhibitory Polypeptides." *Protein Sci*, 1994, 3(10), pp. 1833-9.

Paquette, D. W.; Simpson, D. M.; Friden, P.; Braman, V. and Williams, R. C. "Safety and Clinical Effects of Topical Histatin Gels in Humans with Experimental Gingivitis." *J Clin Periodontol*, 2002, 29(12), pp. 1051-8.

Park, C. J.; Park, C. B.; Hong, S. S.; Lee, H. S.; Lee, S. Y. and Kim, S. C. "Characterization and Cdna Cloning of Two Glycine- and Histidine-Rich Antimicrobial Peptides from the Roots of Shepherd's Purse, Capsella Bursa-Pastoris." *Plant Mol Biol*, 2000, 44(2), pp. 187-97.

Patel, S. U.; Osborn, R.; Rees, S. and Thornton, J. M. "Structural Studies of Impatiens Balsamina Antimicrobial Protein (Ib-Amp1)." *Biochemistry*, 1998, 37(4), pp. 983-90.

Patrickios, CS and Yamasaki, EN. "Polypeptide Amino Acid Composition and Isoelectric Point." *Anal Biochem*, 1995, 231, pp. 82 - 91.

Petit, M. C.; Sodano, P.; Marion, D. and Ptak, M. "Two-Dimensional 1h-Nmr Studies of Maize Lipid-Transfer Protein. Sequence-Specific Assignment and Secondary Structure." *Eur J Biochem*, 1994, 222(3), pp. 1047-54.

Powers, J. P. and Hancock, R. E. "The Relationship between Peptide Structure and Antibacterial Activity." *Peptides*, 2003, 24(11), pp. 1681-91.

Poznanski, J.; Sodano, P.; Suh, S. W.; Lee, J. Y.; Ptak, M. and Vovelle, F. "Solution Structure of a Lipid Transfer Protein Extracted from Rice Seeds. Comparison with Homologous Proteins." *Eur J Biochem*, 1999, 259(3), pp. 692-708.

❖ R ❖

Radzeka, A and Wolfenden, R. "Comparing the Polarities of Amino Acids: Side-Chain Distribution Coefficients between Vapor Phase, Cyclohexane, 1-Octanol and Neutral Aqueous Solution." *Biochemistry*, 1988, 27, pp. 1664 - 70.

Rogers, L. A. "The Inhibiting Effect of Streptococcus Lactis on Lactobacillus Bulgaricus." *J Bacteriol*, 1928, 16(5), pp. 321-5.

Roumestand, C.; Louis, V.; Aumelas, A.; Grassy, G.; Calas, B. and Chavanieu, A. "Oligomerization of Protegrin-1 in the Presence of Dpc Micelles. A Proton High-Resolution Nmr Study." *FEBS Lett*, 1998, 421(3), pp. 263-7.

Roxrud, I.; Lid, S. E.; Fletcher, J. C.; Schmidt, E. D. and Opsahl-Sorteberg, H. G. "Gasa4, One of the 14-Member Arabidopsis Gasa Family of Small Polypeptides, Regulates Flowering and Seed Development." *Plant Cell Physiol*, 2007, 48(3), pp. 471-83.

❖ S ❖

Sæther, O.; Craik, D. J.; Campbell, I. D.; Sletten, K.; Juul, J. and Norman, D. G. "Elucidation of the Primary and Three-Dimensional Structure of the Uterotonic Polypeptide Kalata B1." *Biochemistry*, 1995, 34(13), pp. 4147-58.

Samuelsson, G. and Jayawardene, A. L. "Isolation and Characterization of Viscotoxin 1-Ps from Viscum Album L. Ssp. Austriacum (Wiesb.) Vollmann, Growing on Pinus Silvestris." *Acta Pharm Suec*, 1974, 11(2), pp. 175-84.

Schmidtchen, A.; Frick, I. M.; Andersson, E.; Tapper, H. and Bjorck, L. "Proteinases of Common Pathogenic Bacteria Degrade and Inactivate the Antibacterial Peptide LL-37." *Mol*

Microbiol, 2002, 46(1), pp. 157-68.

Schmidtchen, A.; Frick, I. M. and Bjorck, L. "Dermatan Sulphate Is Released by Proteinases of Common Pathogenic Bacteria and Inactivates Antibacterial Alpha-Defensin." *Mol Microbiol*, 2001, 39(3), pp. 708-13.

Segura, A.; Moreno, M.; Madueno, F.; Molina, A. and Garcia-Olmedo, F. "Snakin-1, a Peptide from Potato That Is Active against Plant Pathogens." *Mol Plant Microbe Interact*, 1999, 12(1), pp. 16-23.

Selsted, M. E.; Novotny, M. J.; Morris, W. L.; Tang, Y. Q.; Smith, W. and Cullor, J. S. "Indolicidin, a Novel Bactericidal Tridecapeptide Amide from Neutrophils." *J Biol Chem*, 1992, 267(7), pp. 4292-5.

Selsted, M. E.; Tang, Y. Q.; Morris, W. L.; McGuire, P. A.; Novotny, M. J.; Smith, W.; Henschien, A. H. and Cullor, J. S. "Purification, Primary Structures, and Antibacterial Activities of Beta-Defensins, a New Family of Antimicrobial Peptides from Bovine Neutrophils." *J Biol Chem*, 1993, 268(9), pp. 6641-8.

Shi, J. and Ganz, T. "The Role of Protegrins and Other Elastase-Activated Polypeptides in the Bactericidal Properties of Porcine Inflammatory Fluids." *Infect Immun*, 1998, 66(8), pp. 3611-7.

Shieh, M. T.; WuDunn, D.; Montgomery, R. I.; Esko, J. D. and Spear, P. G. "Cell Surface Receptors for Herpes Simplex Virus Are Heparan Sulfate Proteoglycans." *J Cell Biol*, 1992, 116(5), pp. 1273-81.

Shin, D. H.; Lee, J. Y.; Hwang, K. Y.; Kim, K. K. and Suh, S. W. "High-Resolution Crystal Structure of the Non-Specific Lipid-Transfer Protein from Maize Seedlings." *Structure*, 1995, 3(2), pp. 189-99.

Simorre, J. P.; Caille, A.; Marion, D. and Ptak, M. "Two- and Three-Dimensional 1h Nmr Studies of a Wheat Phospholipid Transfer Protein: Sequential Resonance Assignments and Secondary Structure." *Biochemistry*, 1991, 30(49), pp. 11600-8.

Skerlavaj, B.; Benincasa, M.; Risso, A.; Zanetti, M. and Gennaro, R. "Smap-29: A Potent Antibacterial and Antifungal Peptide from Sheep Leukocytes." *FEBS Lett*, 1999, 463(1-2), pp. 58-62.

Skerlavaj, B.; Gennaro, R.; Bagella, L.; Merluzzi, L.; Risso, A. and Zanetti, M. "Biological Characterization of Two Novel Cathelicidin-Derived Peptides and Identification of Structural Requirements for Their Antimicrobial and Cell Lytic Activities." *J Biol Chem*, 1996, 271(45), pp. 28375-81.

Song, X.; Zhou, Z.; Wang, J.; Wu, F. and Gong, W. "Purification, Characterization and Preliminary Crystallographic Studies of a Novel Plant Defensin from Pachyrhizus Erosus Seeds." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2004, 60(Pt 6), pp. 1121-4.

Steiner, H.; Hultmark, D.; Engstrom, A.; Bennich, H. and Boman, H. G. "Sequence and Specificity of Two Antibacterial Proteins Involved in Insect Immunity." *Nature*, 1981, 292(5820), pp. 246-48.

Steinstraesser, L.; Tippler, B.; Mertens, J.; Lamme, E.; Homann, H. H.; Lehnhardt, M.; Wildner, O.; Steinau, H. U. and Uberla, K. "Inhibition of Early Steps in the Lentiviral Replication Cycle by Cathelicidin Host Defense Peptides." *Retrovirology*, 2005, 2, pp. 2.

Stuart, L.S. and Harris, T.H. "Bactericidal and Fungicidal Properties of a Crystalline Protein Isolated from Unbleached Wheat Flour." *Cereal Chem.*, 1942, 19, pp. 288-300.

ꝝ T ꝝ

Tagg, J. R.; Dajani, A. S. and Wannamaker, L. W. "Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria." *Bacteriol Rev*, 1976, 40(3), pp. 722-56.

Tailor, R. H.; Acland, D. P.; Attenborough, S.; Cammue, B. P.; Evans, I. J.; Osborn, R. W.; Ray, J. A.; Rees, S. B. and Broekaert, W. F. "A Novel Family of Small Cysteine-Rich Antimicrobial Peptides from Seed of Impatiens Balsamina Is Derived from a Single Precursor Protein." *J Biol Chem*, 1997, 272(39), pp. 24480-7.

Tamamura, H.; Kuroda, M.; Masuda, M.; Otaka, A.; Funakoshi, S.; Nakashima, H.; Yamamoto, N.; Waki, M.; Matsumoto, A.; Lancelin, J. M., et al. "A Comparative Study of the Solution Structures of Tachyplesin I and a Novel Anti-Hiv Synthetic Peptide, T22 ([Tyr5,12, Lys7]-Polyphemusin II), Determined by Nuclear Magnetic Resonance." *Biochim Biophys Acta*, 1993, 1163(2), pp. 209-16.

Tamamura, H.; Xu, Y.; Hattori, T.; Zhang, X.; Arakaki, R.; Kanbara, K.; Omagari, A.; Otaka, A.; Ibuka, T.; Yamamoto, N., et al. "A Low-Molecular-Weight Inhibitor against the Chemokine Receptor Cxcr4: A Strong Anti-Hiv Peptide T140." *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 253(3), pp. 877-82.

Tchang, F.; Laroche-Raynal, M.; Vergnolle, C.; Demandre, C.; Douady, D.; Grosbois, M.; Guerbette, F.; Delsenay, M. and Kader, J. C. "In Vitro Synthesis of a Plant Phospholipid Transfer Protein: A Study by High Performance Liquid Chromatography." *Biochem Biophys Res Commun*, 1985, 133(1), pp. 75-81.

Terras, F. R.; Eggermont, K.; Kovaleva, V.; Raikhel, N. V.; Osborn, R. W.; Kester, A.; Rees, S. B.; Torrekens, S.; Van Leuven, F.; Vanderleyden, J., et al. "Small Cysteine-Rich Antifungal Proteins from Radish: Their Role in Host Defense." *Plant Cell*, 1995, 7(5), pp. 573-88.

Thevissen, K.; Ferket, K. K.; Francois, I. E. and Cammue, B. P. "Interactions of Antifungal Plant Defensins with Fungal Membrane Components." *Peptides*, 2003, 24(11), pp. 1705-12.

Thevissen, K.; Francois, I. E.; Takemoto, J. Y.; Ferket, K. K.; Meert, E. M. and Cammue, B. P. "Dmamp1, an Antifungal Plant Defensin from Dahlia (Dahlia Merckii), Interacts with Sphingolipids from *Saccharomyces Cerevisiae*." *FEMS Microbiol Lett*, 2003, 226(1), pp. 169-73.

Thomma, B. P.; Cammue, B. P. and Thevissen, K. "Plant Defensins." *Planta*, 2002, 216(2), pp. 193-202.

Trevino, M. B. and MA, O. Connell. "Three Drought-Responsive Members of the Nonspecific Lipid-Transfer Protein Gene Family in *Lycopersicon Pennellii* Show Different Developmental Patterns of Expression." *Plant Physiol*, 1998, 116(4), pp. 1461-8.

Tsai, H. and Bobek, L. A. "Human Salivary Histatins: Promising Anti-Fungal Therapeutic Agents." *Crit Rev Oral Biol Med*, 1998, 9(4), pp. 480-97.

Ѡ V ዘ

Van den Bergh, K. P.; Rouge, P.; Proost, P.; Coosemans, J.; Krouglova, T.; Engelborghs, Y.; Peumans, W. J. and Van Damme, E. J. "Synergistic Antifungal Activity of Two Chitin-Binding Proteins from Spindle Tree (*Euonymus Europaeus L.*)." *Planta*, 2004, 219(2), pp. 221-32.

Van Den Hooven, H. W.; Doeland, C. C.; Van De Kamp, M.; Konings, R. N.; Hilbers, C. W. and Van De Ven, F. J. "Three-Dimensional Structure of the Lantibiotic Nisin in the Presence of Membrane-Mimetic Micelles of Dodecylphosphocholine and of Sodium Dodecylsulphate." *Eur J Biochem*, 1996, 235(1-2), pp. 382-93.

Vernon, L. P.; Evett, G. E.; Zeikus, R. D. and Gray, W. R. "A Toxic Thionin from Pyrularia Pubera: Purification, Properties, and Amino Acid Sequence." *Arch Biochem Biophys*, 1985, 238(1), pp. 18-29.

Vizioli, Jacopo and Salzet, Michel. "Antimicrobial Peptides Versus Parasitic Infections?" *Trends in Parasitology*, 2002, 18(11), pp. 475-76.

Ѡ W ዘ

Walujono, K.; Scholma, R.A.; Beintema, J.J.; Marilano, A. and Hahn, A.M. "Amino Acid Sequence of Hevein." *Proc. Int. Rubber Conference*. Kuala Lumpur, Malaysia, 1975, 518–31.

Witherup, K. M.; Bogusky, M. J.; Anderson, P. S.; Ramjit, H.; Ransom, R. W.; Wood, T. and Sardana, M. "Cyclopsychotride a, a Biologically Active, 31-Residue Cyclic Peptide Isolated from Psychotria Longipes." *J Nat Prod*, 1994, 57(12), pp. 1619-25.

Witte, W. "Impact of Antibiotic Use in Animal Feeding on Resistance of Bacterial Pathogens in Humans." *Ciba Found Symp*, 1997, 207, pp. 61-71; discussion 71-5.

Wong, J. H.; Xia, L. and Ng, T. B. "A Review of Defensins of Diverse Origins." *Curr Protein Pept Sci*, 2007, 8(5), pp. 446-59.

WuDunn, D. and Spear, P. G. "Initial Interaction of Herpes Simplex Virus with Cells Is Binding to Heparan Sulfate." *J Virol*, 1989, 63(1), pp. 52-8.

Ѡ X ዘ

Xu, T.; Levitz, S. M.; Diamond, R. D. and Oppenheim, F. G. "Anticandidal Activity of Major Human Salivary Histatins." *Infect Immun*, 1991, 59(8), pp. 2549-54.

Ѡ Y ዘ

Yang, L.; Harroun, T. A.; Weiss, T. M.; Ding, L. and Huang, H. W. "Barrel-Stave Model or Toroidal Model? A Case Study on Melittin Pores." *Biophys J*, 2001, 81(3), pp. 1475-85.

Yubero-Serrano, E. M.; Moyano, E.; Medina-Escobar, N.; Munoz-Blanco, J. and Caballero, J. L. "Identification of a Strawberry Gene Encoding a Non-Specific Lipid Transfer Protein That Responds to Aba, Wounding and Cold Stress." *J Exp Bot*, 2003, 54(389), pp. 1865-77.

☞ Z ☞

Zeya, H. I. and Spitznagel, J. K. "Cationic Proteins of Polymorphonuclear Leukocyte Lysosomes. I. Resolution of Antibacterial and Enzymatic Activities." *J Bacteriol*, 1966, 91(2), pp. 750-4.

Zhang, Y. and Lewis, K. "Fabatins: New Antimicrobial Plant Peptides." *FEMS Microbiol Lett*, 1997, 149(1), pp. 59-64.

Zhu, S.; Darbon, H.; Dyason, K.; Verdonck, F. and Tytgat, J. "Evolutionary Origin of Inhibitor Cystine Knot Peptides." *FASEB J*, 2003, 17(12), pp. 1765-7.

Annexes

Publications scientifiques internationales

- **Riad Hammami**, Abdelmajid Zouhir, Jeannette Ben Hamida and Ismail Fliss (2007). «BACTIBASE: a new web-accessible database for bacteriocin characterization». *BMC Microbiology*, **7**:89. (facteur d'impact 2.98)
- Naghmouchi K., Drider D., **Hammami R.** and Fliss, I. (2008) « Effect of antimicrobial peptides: divergicin M35 and nisin A on *Listeria monocytogenes* LSD530 potassium». *Current Microbiology*, **56**(6):609-12. (facteur d'impact 1.0)

Publications scientifiques nationales (Tunisie)

- Fedhila S, **Hammami R**, Fliss I et Ben Hamida J (2008). « les molécules anti-infectieuses des plantes : de l'usage thérapeutique à la bio-préservation alimentaire ». *Revue de l'INAT* vol 22 (Français) [ISSN 0330-8065].
- **Hammami R**, Fliss I, Neffati M, Vergoten G and Ben Hamida J (2007) Mise en évidence de peptides à activité antimicrobienne chez des plantes spontanées des zones arides de la Tunisie. *Revue des Régions Arides* - Numéro spécial - Actes SIPAM 2006, p287-293 (français) [ISSN 0330-7956]

Communications scientifiques

- **Riad Hammami**, Ismail Fliss, Mohammed Neffati and Jeannette Ben Hamida (2009). "A new antimicrobial peptide isolated from *Oudheya africana* seeds". Third International Symposium on MEDICINAL AND AROMATIC PLANTS : SIPAM2009, 26-28 March, Djerba, Tunisia.
- **Riad Hammami**, Abdelmajid ZOUHIR, Jeannette BEN HAMIDA and Ismail FLISS (2008). «Use of Scientific Database Maker for the Characterization of Protein Sequences and Design of Specialized Biological Databases». Semaine en science et technologie laitières de la FIL, 12-16 mai, Québec, Canada (Communication par affiche).
- **Riad Hammami**, Abdelmajid ZOUHIR, Jeannette BEN HAMIDA and Ismail FLISS (2008). «A New Central Source for Bacteriocins Characterization». Semaine en science et technologie laitières de la FIL, 12-16 mai, Québec, Canada (Communication par affiche).
- **Riad Hammami**, Abdelmajid ZOUHIR, Jeannette BEN HAMIDA and Ismail FLISS (2008). «SciDBMaker: un nouvel outil pour la conception de bases de données biologiques spécialisées, Application pour la caractérisation des bactériocines: BACTIBASE». 76^e Congrès de l'Acfas, 5-9 mai, Québec, Canada (Communication orale).
- Zouhir A., **Hammami R.**, Fliss I. et Ben Hamida J. (2008). « BACTIBASE: corrélations microbiologiques et caractérisation physico-chimique *in silico* des bactériocines ». 19èmes Journées Biologiques — 3^{èmes} Journées de Biotechnologie, 24-27 Mars, Hammamet, Tunisie (Communication par affiche).
- FARHAT I., **Hammami R.**, FLISS I., BEN HAMIDA J. (2007). « Mise en évidence d'activité anti-Listeria à partir d'une plante spontanée désertique *Calligonum comosum* ». 18èmes Journées Biologiques — 2^{èmes} Journées de Biotechnologie, 25-28 Mars, Hammamet, Tunisie (Communication par affiche).
- **Hammami Riadh**, FLISS Ismail, NEFFATI Mohamed, VERGOTEN Gérard & BEN HAMIDA Jeannette (2006). « Mise en évidence de peptides à activité antimicrobienne chez plantes des zones arides de la Tunisie». Symposium international sur Les plantes à Parfums, Médicinales et Aromatiques : de la

Production à la Valorisation, 02-04 Novembre, Djerba, Tunisie (communication par affiche).

- **HAMMAMI Riadh**, VERGOTEN Gérard, BEN HAMIDA Jeannette & FLISS Ismaïl (2006). « Detection and purification of phytopeptides with antimicrobial activity in wild plants from arid regions of Tunisia». Symposium sur Les peptides à activité antimicrobienne, 19-21 juin, Nantes, France (communication par affiche).
- **HAMMAMI Riadh**, NEFFATI Mohamed, VERGOTEN Gérard, FLISS Ismail & BEN HAMIDA Jeannette (2006). « Étude de l'activité antimicrobienne de plantes des zones arides de la Tunisie». 17^{èmes} journées de l'ATSB, 20-23 Mars, Hammamet, Tunisie (communication par affiche).

BACTIBASE: a new web-accessible database for bacteriocin characterization

Riad Hammami^{†1}, Abdelmajid Zouhir^{†1}, Jeannette Ben Hamida¹ and Ismail Fliss*²

Address: ¹Unité de Protéomie Fonctionnelle & Biopréservation Alimentaire, Institut Supérieur des Sciences Biologiques Appliquées de Tunis, Université El Manar, Tunisie and ²Institut des Nutraceutiques et des Aliments Fonctionnels (INAF), Québec, Université Laval, Canada

Email: Riadh Hammami - riadh.hammami@fst.rnu.tn; Abdelmajid Zouhir - azouheirb10@yahoo.fr; Jeannette Ben Hamida - benhamida.jeannette@yahoo.fr; Ismail Fliss* - ismail.fliss@aln.ulaval.ca

* Corresponding author †Equal contributors

Published: 17 October 2007

Received: 31 May 2007

BMC Microbiology 2007, 7:89 doi:10.1186/1471-2180-7-89

Accepted: 17 October 2007

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/7/89>

© 2007 Hammami et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Bacteriocins are very diverse group of antimicrobial peptides produced by a wide range of bacteria and known for their inhibitory activity against various human and animal pathogens. Although many bacteriocins are now well characterized, much information is still missing or is unavailable to potential users. The assembly of such information in one central resource such as a database would therefore be of great benefit to the exploitation of these bioactive molecules in the present context of increasing antibiotic resistance and natural bio-preservation need.

Description: In the present paper, we present the development of a new and original database BACTIBASE that contains calculated or predicted physicochemical properties of 123 bacteriocins produced by both Gram-positive and Gram-negative bacteria. The information in this database is very easy to extract and allows rapid prediction of relationships structure/function and target organisms of these peptides and therefore better exploitation of their biological activity in both the medical and food sectors.

Conclusion: The BACTIBASE database is freely available at <http://bactibase.pfba-lab.org>, web-based platform enabling easy retrieval, via various filters, of sets of bacteriocins that will enable detailed analysis of a number of microbiological and physicochemical data.

Effect of Antimicrobial Peptides Divergicin M35 and Nisin A on *Listeria monocytogenes* LSD530 Potassium Channels

Karim Naghmouchi · Djamel Drider ·
Riad Hammami · Ismail Fliss

Received: 22 November 2007 / Accepted: 11 January 2008 / Published online: 1 April 2008
© Springer Science+Business Media, LLC 2008

Abstract The aim of this work was to study the effect of antimicrobial peptides: divergicin M35 and nisin A on *Listeria monocytogenes* LSD 530 potassium (K^+) channels: ATP-sensitive (K_{ATP}), calcium-activated (BK_{Ca}), and depolarization-activated (K_v) types. Increase on K^+ efflux and inhibition of cellular growth were observed after adding K^+ channel activators pinacidil, NS1619, and cromakalim to divergicin M35. Increase in K^+ efflux from log-phase cells was about 18 ± 1.1 , 11 ± 0.63 , and nmol mg $^{-1}$ of cell dry weight (CDW) for pinacidil and NS1619, respectively, over the efflux obtained with divergicin M35 alone. Increases in K^+ efflux obtained by adding the same K^+ channel activators to nisin A fit a completely different profile. Divergicin M35 activates K^+ channels, particularly of the K_v and BK_{Ca} types and to a lesser extent the K_{ATP} type, causing K^+ efflux and consequently cell death.

Introduction

Bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB) are ribosomal-synthesized peptides showing antimicrobial activity mainly against a wide range of Gram-positive bacteria [10]. So far, nisin and pediocin PA-1 are examples of bacteriocins from LAB that have found legal applications as food preservatives. Like other natural antimicrobial peptides, LAB bacteriocins could act primarily at the cytoplasmic membranes of susceptible microorganisms [12]. The mode of action of bacteriocin from Gram-positive bacteria has been extensively studied [4, 7, 9]. These bacteriocins are believed to induce permeabilization of the target cell membrane, by forming ion-selective pores leading to dissipation of the proton motive force, an efflux of amino acids, potassium ions, and inorganic phosphate from sensitive strains. Chen and Montville [3] showed that bacteriocin forms poration complexes in the membrane through a multistep process of binding, insertion, and pore formation. Suzuki et al. [15] showed that pore formation by piscicocin CS526 caused a rapid efflux of small molecules such as K^+ from the indicator cells, which leads to cell death. Recently, Naghmouchi et al. [13] concluded that cell death of listerial strains upon addition of divergicin M35 could result from K^+ efflux, which reached 87% of the total ion content.

In the present work, the mode action of antimicrobial peptides (divergicin M35 and nisin A) on K^+ channel of *L. monocytogenes* LSD 530 was studied. Divergicin M35 (pediocin-like bacteriocin, class IIa) and nisin A (lantibiotic, class I) were added to ATP-sensitive, calcium-activated, or depolarization-activated K^+ channel activators and their effect on cell growth and K^+ efflux was determined for both *L. monocytogenes* LSD 530 and its variants, resistant vA and vD strains.

K. Naghmouchi · I. Fliss
STELA Dairy Research Center, Nutraceuticals and Functional Foods Institute, Université Laval, G1K 7P4 Québec, QC, Canada

D. Drider (✉)
UMR INRA 1014 SECALIM, ENITIAA, ENVN, INRA, Rue de la Géraudière, BP82225, 44322 Nantes Cedex, France
e-mail: drider@enitia-nantes.fr

R. Hammami
UMR CNRS 8576, Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq Cedex, France

K. Naghmouchi
Agriculture and Agri-Food Canada, Lethbridge Research Centre, Lethbridge, Alberta, Canada T1J 4B1

Mise en évidence de peptides à activité antimicrobienne chez des plantes spontanées des zones arides de la Tunisie

HAMMAMI Riadh^{1,4}, FLISS Ismail^{1,2}, NEFFATI Mohamed³,
VERGOTEN Gérard⁴, & BEN HAMIDA Jeannette¹

¹ Unité de Protéomie Fonctionnelle et Biopréservation Alimentaire, Institut Supérieur des Sciences Biologiques Appliquées de Tunis, Université El Manar, Tunisie

² Centre de recherche STELA, Québec. Université Laval, Canada

³ Laboratoire de l'Écologie Pastorale, Institut National des Régions Arides, Médenine, Tunisie

⁴ UMR CNRS 8576 «Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle», Université Sciences et Technologie de Lille, France

Correspondances à : benhamida_jeannette@yahoo.fr Fax : +216 71 573 526
Institut Supérieur des Sciences Biologiques Appliquées de Tunis, 9, rue Zouhaier Essefi, Tunis 1080, Tunisie

RESUME

Trois espèces spontanées, *Oudneya africana*, *Juniperus phoenicea*, et *Pistacia atlantica*, issues des régions arides de la Tunisie, ont été sélectionnées et étudiées pour leur activité antimicrobienne contre des bactéries pathogènes d'origine alimentaire. Différentes méthodes ont été utilisées pour extraire la fraction peptidique de ces plantes. Les résultats obtenus montrent que plusieurs extraits sont capables d'inhiber la croissance des différentes souches pathogènes gram-positives (*Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*) et gram-négatives (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*). Les extraits actifs de chaque espèce ont montré une certaine sensibilité à différentes protéases notamment la trypsine, l' α -chymotrypsine, la pronase E et la subtilisine A. Un essai de purification par HPLC et d'analyse par spectrométrie de masse des peptides actifs est en cours.

Mots-clés : Activité antimicrobienne, plantes, peptides, pathogènes alimentaires.

SUMMARY

Three wild plant species, *Oudneya africana*, *Juniperus phoenicea* and *Pistacia atlantica*, indigenous to the arid regions of Tunisia, were selected and examined for their antimicrobial activity against bacterial pathogens of food origin. Crude protein extracts were prepared using different protocols. Several of these extracts inhibited growth of both Gram-positive (*Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*) and Gram-negative (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) pathogens. They were shown to be sensitive to several proteases including α -trypsin, α -chymotrypsin, pronase E and subtilisin A. Purification of putative active peptides is in progress.

Key-words: Antimicrobial activity, plants, peptides, pathogens, food.

1- INTRODUCTION

Les semences sont connues par leurs systèmes de défense contre les microbes. Ces semences sont généralement riches en protéines et spécialement en peptides dotés d'une activité antimicrobienne [1]. D'une façon générale, les peptides antimicrobiens des plantes inhibent la croissance des bactéries par des mécanismes différents de ceux des antimicrobiens utilisés aujourd'hui et peuvent avoir une valeur pharmaceutique et bio-industrielle importante dans le traitement des microbes résistants [2].

Dans ce travail nous rapportons un criblage de l'activité antibactérienne et une analyse physicochimique préliminaire des extraits aqueux des semences de *Juniperus phoenicea* L., d'*Oudneya africana* R.Br et de *Pistacia atlantica* Desf., trois espèces spontanées des régions arides de la Tunisie. Les extraits des semences ont été fractionnés et testés pour leurs propriétés antimicrobiennes contre des bactéries pathogènes d'origine alimentaire.