



Université de Lille – Sciences et Technologies
Ecole doctorale Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement

Thèse de Doctorat

Spécialité : Ingénierie des Fonctions Biologiques

Présentée pour l'obtention du grade de docteur de l'Université de Lille

Présentée par

Cyril Raveschot

**Recherche d'ingrédients actifs, issus de Lactobacilles,
utilisables pour la prévention de l'ostéoporose**

THESE CONFIDENTIELLE

Préparée à Institut Charles Viollette – ICV – EA 7394

Soutenue le 19 Décembre 2018, devant le jury composé de :

Dr. (HDR) Véronique Monnet	Directrice de recherche (INRA Jouy en Josas)	Rapporteur
Pr. Annie Dary-Mouroit	Professeur (Université de Lorraine)	Rapporteur
Dr. Véronique Delcenserie	Chargé de cours (Université de Liège)	Examineur
Dr. Marc Frémont	Directeur R&D (VF Bioscience)	Examineur
Pr. Pascal Dhulster	Professeur (Université de Lille)	Directeur de thèse
Pr. Djamel Drider	Professeur (Université de Lille)	Co-directeur de thèse
Dr. François Coutte	Maître de conférences (Université de Lille)	Co-encadrant – invité
Dr. Benoit Cudennec	Maître de conférences (Université de Lille)	Co-encadrant – invité
Dr. (HDR) Christophe Flahaut	Maître de conférences (Université d'Artois)	Co-encadrant - invité

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail. En particulier à Véronique Monnet et Annie Dary-Mouroit pour avoir été rapporteurs de cette thèse, ainsi qu'à Véronique Delcenserie pour avoir tenu le rôle de présidente du jury. Je garderai toujours un souvenir agréable de nos échanges pendant la soutenance.

Je tiens à remercier Pascal Dhulster, déjà pour m'avoir appelé en personne afin de me proposer cette thèse, mais également pour l'avoir dirigée au cours de ces trois années. Merci de m'avoir accueilli au sein du laboratoire et supporté pendant tout ce temps, je n'oublierai jamais l'opportunité que vous m'avez offerte et j'espère avoir été à la hauteur de vos attentes.

Un immense merci à Marc Frémont pour la confiance qu'il m'a accordé et son implication dans ce travail de thèse. Merci également pour m'avoir laissé une complète liberté sur les décisions et les travaux réalisés. Je n'ai jamais ressenti la moindre pression du côté de l'entreprise et je sais que ce n'est pas toujours le cas pour les thèses CIFRE. Enfin merci de m'avoir fait confiance pour l'après, je suis ravi de pouvoir poursuivre l'aventure et j'espère que l'on ira loin.

Je souhaite remercier Djamel Drider pour avoir accepté de co-diriger cette thèse. Merci pour tous ces échanges, toutes ces personnes que j'ai pu rencontrer grâce à vous et d'avoir été là dans les moments les plus urgents. Avec vous, j'ai pu faire partie d'une deuxième équipe au sein de l'ICV ce qui fut extrêmement enrichissant.

Sans eux, cette thèse ne serait rien, c'est pourquoi je remercie du fond du cœur mes trois encadrants, François Coutte, Benoît Cudennec et Christophe Flahaut. Ils m'ont chacun apporté des compétences dans des disciplines variées me permettant d'acquérir une vision d'ensemble du projet. Je suis devenu une espèce de caméléon capable de parler à la fois de microbiologie, de biochimie, de fermentation, de probiotiques, de peptides bioactifs, d'ACP, de culture cellulaire et d'un peu de spectrométrie de masse sans toutefois être spécialiste d'aucun de ces domaines. Sans vous, je n'aurais jamais pu acquérir autant de compétences et je suis conscient de la chance énorme que j'ai eu de travailler avec vous trois. J'espère que nous continuerons à travailler ensemble pendant longtemps, ou à défaut à rester en contact autour d'une bière.

François, merci pour ton implication sans faille, pour m'avoir toujours soutenu et poussé à aller plus loin. Sans toi je n'aurais jamais touché un bioréacteur et le procédé en continu n'aurait jamais vu le jour ce qui aurait particulièrement nuit au projet.

Benoit, merci pour ton soutien infaillible, ton imagination débordante et ton optimisme à toute épreuve. J'ai toujours admiré la passion que tu as dans ton travail et ce fut un réel bonheur de travailler avec toi.

Christophe, merci pour ta pédagogie, ta patience et ton regard toujours pertinent sur mes travaux. Avec ton petit côté paternel, tu m'as appris à temporeriser quand parfois je m'emballais dans les idées et les manip.

Je tiens à remercier Corinne Granette pour m'avoir suivi tout au long de cette thèse jusqu'à la soutenance. J'ai toujours admiré votre travail et j'ai eu de la chance d'avoir pu profiter de votre talent dans le domaine des probiotiques. Merci également à Jeanne Alard.

On a rejoint le laboratoire presque au même moment et c'était une chance pour moi, merci à Aurélie Mateos pour avoir partagé son expertise en matière d'activité protéolytique des souches bactériennes. Grâce à toi, j'ai pu rencontrer Magali Genay que je remercie également pour ce moment passé lors du CBL. Et merci à Xavier Lecomte pour ces heures passées au téléphone à discuter science, ton expérience m'a plus que servi au début de ma thèse.

Merci à Valérie Schwalek pour m'avoir fait découvrir le monde complexe de la propriété intellectuelle. Grâce à votre pédagogie, j'ai beaucoup appris durant nos réunions, je vous remercie aussi pour tous vos encouragements.

Je tiens particulièrement à remercier trois personnes qui ont contribué directement aux expérimentations de cette thèse. Ainsi je remercie Barbara Deracinois pour avoir réalisé les analyses en spectrométrie de masse, sans elle les longues listes de peptides ne seraient pas dans ce manuscrit. Merci à toi pour tes compétences, mais également pour ta bonne humeur, et tes éclats de rire très sonores, ne change rien. Merci à Emmeline Bertrand pour son aide précieuse au cours des fermentations en continu. Je pense que si tu n'avais pas été là, je serai encore en train de m'acharner sur les bioréacteurs, merci pour tous ces fous rires pendant les manip, je te souhaite pleins de bonnes choses pour la suite. Merci également à Lawran Lowenski pour les travaux qu'elle a réalisés dans le cadre de l'étude sur les probiotiques. Je pense que pour une première étudiante à encadrer je n'aurai pas pu rêver mieux que toi.

Je remercie toute l'équipe du laboratoire pour m'avoir accompagné durant ces trois années. Une pensée particulière pour Corinne ma maman du labo, pour Cathy qui s'est démenée pour mes commandes et pour Gabrielle et sa bonne humeur. Merci à mes collègues de la culture cell, Camille, Rezak, Yanath et Dorothee parce que c'était juste un plaisir de travailler avec vous.

Merci à Egon pour m'avoir permis d'utiliser l'équipement sur RealCat, je suis encore désolé d'avoir bouché un fermenteur. Merci à toutes ces personnes du labo qui font (ou ont fait) en sorte que le boulot se passe dans la joie et la bonne humeur, Rozenn, Rénato, Françoise, Valérie, Matthieu, Delphine, Florie, Qassim, Julien, Leandro. Merci à toute l'équipe Deino pour l'ambiance qu'ils amènent au labo, clin d'œil à ma chère Marjorie pour tous nos potins en culture cell.

Un immense merci à Caroline Rambaud, parce que sans elle jamais je n'aurais eu l'idée folle de me lancer dans une thèse. Tu m'as appris toutes les bases et donné l'envie de poursuivre vers une voie que j'étais loin d'envisager au départ, pour cela je t'en serai éternellement reconnaissant.

Parce que ce sont les meilleurs, un grand merci à mes collègues doctorants et docteurs, merci pour tous ces moments partagés que ce soit dans ou en dehors du labo. Désolé pour les fois où je râlais, où j'arrivais le matin encore alcoolisé de la veille (même si souvent c'était à cause de vous). J'ai une pensée particulière pour ceux qui sont devenus plus que des collègues avec qui j'ai pu tout partager : Juliette qui fut littéralement ma psy pendant trois ans à qui j'ai pu raconter toutes mes joies et galères et qui est devenue une amie très chère. Maxime, parce que grâce à toi je sais ce que c'est que d'avoir un grand frère. Antoine, parce que Pokémon et Skyrim n'ont aucun secret pour nous et que je n'oublierai jamais notre aventure romaine et nos semaines de colloc. Alexandra, ma topine de commérage. Mike, parce qu'on aura failli terminer la thèse le même jour. Rémi, toi tu étais un ami bien avant la thèse et enfin Sandy, ma partenaire de thèse CIFRE. Merci également à Delphine, Kalim, Yazeen, Debarun, Nuria, mon Bricout, Justine, Oumaïma, Alexandre, Elodie, Quentin, Ali, Alice et Ludivine. Bon courage pour les futurs docteurs.

Pour terminer, merci à mes parents et à ma famille qui sont venus nombreux pour la soutenance. Bravo maman pour l'organisation du pot. Merci à mes très chers amis, Coralie, Gianni, Pamela, Mathieu, Angelina, Barbara, Chrysoline, Wail, Sarah et enfin, merci à Seb juste parce que tu es là.

Résumé

Les Lactobacilles sont maintenant largement reconnus pour différentes applications santé. Que ce soit par la production de biomolécules actives ou encore via une action probiotique, les Lactobacilles peuvent être utilisés pour le traitement de plusieurs affections. Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse est la recherche d'applications santé, applicables à la prévention de l'ostéoporose, à partir de Lactobacilles. Les 170 souches bactériennes étudiées au cours de ce projet ont été isolées en Mongolie à partir de différents produits laitiers.

Dans ce but, deux approches ont été définies, la première consiste en l'utilisation des souches en tant que probiotiques, la seconde approche concerne la production de peptides bioactifs issus de l'hydrolyse des protéines laitières par ces Lactobacilles. Après criblage et sélection de souches potentiellement probiotiques, la capacité des souches à moduler l'absorption du calcium au niveau intestinal a été étudiée. Pour l'approche peptides, différents criblages ont également été réalisés comprenant une stratégie de criblage originale basée sur l'analyse multiparamétrique de la protéolyse en lait. Ces travaux ont permis de sélectionner 3 souches pour la suite du projet, et différents hydrolysats peptidiques ont été produits par fermentation du lait en bioréacteur. Les hydrolysats produits ont été testés pour différentes activités en lien avec la prévention de l'ostéoporose comme l'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ou la modulation de l'absorption intestinale du calcium. Différentes activités ont ainsi été mises en évidence pour les différents hydrolysats. De ces résultats, un procédé en continu utilisant un bioréacteur à membrane, a été développé afin de produire un hydrolysats peptidique d'intérêt. Ces travaux ont permis de mettre en évidence différentes applications santé à partir d'une collection de souches de Lactobacilles.

Mots clés : Lactobacilles, Ostéoporose, probiotique, protéines laitières, peptides bioactifs, fermentation.

Abstract

Lactobacilli are bacteria of major interest for health applications. These species are able to produce different active biomolecules by fermentation or exert a probiotic action. Thus, Lactobacilli represent a source of different ingredients which could be used for various health purposes. The objective of the present research is to study the potential of different lactobacilli to be used as ingredients dedicated to osteoporosis prevention. This work is based on a collection of 170 *Lactobacillus* strains isolated from dairy products in Mongolia.

Two different strategies were undertaken: the use of lactobacilli as probiotics or the production of bioactive peptides by fermentation of milk proteins. A screening based on some probiotic characteristics allowed to select *Lactobacillus* strains which were studied for their capacity to modulate the intestinal calcium absorption. In the same way, screenings were used to select strains with important proteolytic abilities. Particularly, an original screening strategy, based on a multiparametric analysis of proteolysis occurring in milk was developed in this study. Milk protein hydrolysates were produced using the selected strains by batch fermentation of milk in bioreactor. The resulting products were then studied for different biological activity linked to bone health like angiotensin-converting enzyme inhibition or modulation of intestinal calcium absorption. By these results, an integrated continuous process, using a membrane bioreactor, was developed to produce an active ingredient by fermentation. This work highlights the potential health applications of some lactobacilli.

Key words: lactobacilli, Osteoporosis, probiotic, milk proteins, bioactive peptides, fermentation.

Liste des abréviations

ACE : Angiotensin converting enzyme
ACN : Acétonitrile
ACP : Analyse en composantes principales
AGE : Advanced glycation end product
AT1R : Angiotensin II receptor type I
BMD : Bone mineral density
BPM : Bone morphogenetic protein
CasR : Calcium sensing receptor
CCK-8 : Cell counting kit-8
CEP : Cell envelope proteinase
CFU : Colony forming unit
CPP : Casein phosphopeptide
DGI : Digestion gastro-intestinale
DMEM : Dulbecco's modified Eagle medium
DO : Densité optique
Dpp : ABC transporter
DPP-IV : Dipeptidyl peptidase-IV
Dtp : Ion linked transporter for di and tripeptides
EDTA : Ethylene diamine tetra acetic acid
ER : Estrogens receptor
GH : Growth hormone
GIP : Glucose-dependant insulintropic polypeptide
GLP-1 : Glucagon like peptide-1
GRAS : Generally regarded as safe
IBS : Irritable bowel syndrome
IC₅₀ : Concentration inhibitrice médiane
IGF : Insulin like growth factor
L. : *Lactobacillus*
LDH : Lactate dehydrogenase
MATS : Microbial adhesion to solvents
MBPDB : Milk bioactive peptide database
MD : Maltodextrine
MICIs : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
MRS : De Man, Rogosa et Sharpe
NCX1 : Sodium-calcium exchanger 1
NGP : Next generation probiotic
OPG : Ostéoprotégérine
Opp : Oligopeptide permease
PAMP : Pathogen associated molecular pattern
PBPM : Peptide de bas poids moléculaire
PBS : Phosphate buffered saline
Pep : Peptidase
PHPM : Protéine/peptide de haut poids moléculaire
PLR : Pattern recognition receptor
PMCA : Plasma membrane Ca²⁺ ATPase

PNC : Protéines non collagéniques
PPIA : Peptidylprolyl isomerase A
PTH : Parathyroid hormone
QPS : Qualified presumption of safety
QSAR : Quantitative structure activity relationship
RANK : Receptor activating nuclear factor κ B
REP-PCR : Repetitive extragenic palindromic-polymerase chain reaction
ROS : Reactive oxygen species
SCFA : Short chain fatty acid
SERM : Selective estrogen-receptor modulator
SPE : Solid phase extraction
SRA : Système rénine angiotensine
TCA : Trichloro acetic acid
TEER : Transepithelial electrical resistance
TFA : Trifluoro acetic acid
TGF- β : Transforming growth factor β
TLR : Toll like receptor
TNF- α : Tumor necrosis factor- α
TRPV6 : Transient receptor potential vanilloid 6
UFP : Perméât d’ultrafiltration
UFR : Rétentât d’ultrafiltration
UPGMA : Unweighted pair group method with arithmetic mean
VDR : Vitamin D receptor

Sommaire

Préambule	18
Chapitre 1 : Introduction générale	19
I. L'ostéoporose, définition en quelques chiffres	20
II. L'ostéoporose, une conséquence de perturbations du métabolisme	22
1. Le métabolisme osseux	22
1.1. La composition du tissu osseux	22
1.2. Le remodelage osseux.....	25
1.3. Les facteurs locaux de régulation du remodelage osseux.....	26
2. Le déclin du remodelage osseux conduisant à l'ostéoporose.....	28
3. Les liens avec d'autres métabolismes	31
3.1. Les hormones sexuelles	32
3.2. Le stress oxydatif.....	32
3.3. Les impacts de l'intestin et du métabolisme énergétique	34
3.3.1. L'implication des hormones intestinales	34
3.3.2. Les inflammations de l'intestin et son microbiote.....	38
3.4. L'absorption du calcium	40
3.4.1. La physiologie du calcium	40
3.4.2. La régulation de l'homéostasie du calcium et impacts sur le squelette.....	43
3.5. Le système rénine angiotensine	45
3.5.1. La nouvelle vision du système rénine angiotensine	45
3.5.2. Les liens entre le système rénine angiotensine et le système osseux	47
III. De nouvelles stratégies de prévention dont l'utilisation des Lactobacilles	48
1. L'impact des traitements et stratégies de prévention actuelles	48
2. Une alimentation santé appliquée à la prévention de l'ostéoporose	51
2.1. Une nutrition pour médecine	51
2.3. Des ingrédients actifs améliorant la santé osseuse	53
3. Les Lactobacilles, sources d'ingrédients santé	55
3.1. Des généralités sur les Lactobacilles	55
3.2. Un genre bactérien diversifié.....	58
3.3. De potentiels sources d'ingrédients santé.....	59
3.3.1. La production d'exopolysaccharides.....	59
3.3.2. La synthèse de vitamines.....	61
3.3.3. La production de peptides bioactifs.....	63
3.3.4. L'utilisation en tant que probiotiques.....	63
IV. Conclusion.....	64
Chapitre 2 : Matériels et méthodes	65
I. Une collection de bactéries lactiques isolées en Mongolie	66

II. Criblages de la collection.....	68
1. Sélection de souches potentiellement probiotiques.....	68
1.1. Selon la tolérance à l'acidité.....	68
1.2. Selon l'hydrophobie pariétale.....	68
2. Sélection de souches protéolytiques selon la méthode des géloses au lait.....	70
III. Etude des caractères probiotiques	71
1. Génotypage des souches par REP-PCR.....	71
2. Test d'auto-agrégation	72
3. Evaluation de la tolérance à la digestion gastro-intestinale	72
4. Test de cytotoxicité.....	74
5. Evaluation de l'adhésion des souches aux cellules intestinales	75
IV. Etude de l'impact des souches sur le métabolisme du calcium et de la vitamine D	76
1. Protocole général de contact entre les souches bactériennes et les cellules intestinales	76
2. Mesure du transport total du calcium.....	77
3. Mesure de l'incorporation du calcium au sein des cellules intestinales.....	78
4. Etude de l'expression de différents gènes impliqués dans le métabolisme du calcium et de la vitamine D.....	79
V. Analyse multiparamétrique de la protéolyse en lait écrémé.....	82
1. Principe de l'analyse multiparamétrique.....	82
2. Cultures en lait écrémé.....	83
3. Etude du comportement des souches en lait écrémé.....	83
3.1. Mesure de la croissance bactérienne.....	83
3.2. Mesure des quantités de peptides produits et de leur répartition en poids moléculaire.....	84
3.2.1. Extraction et purification des peptides produits	84
3.2.2. Dosage au réactif de Folin-Ciocalteu	85
3.2.3. Analyse par chromatographie d'exclusion stérique	85
3.3. Analyse du comportement des souches en lait écrémé.....	86
4. Etude des spécificités protéolytiques des souches	86
4.1. Détection des gènes codant les protéases pariétales par PCR.....	86
4.2. Identification des peptides produits par spectrométrie de masse.....	88
4.3. Etablissement et analyse des cartographies peptidiques.....	89
VI. Production des hydrolysats peptidiques par fermentation.....	90
1. Fermentation en bioréacteur.....	90
2. Traitements et analyses des fermentats produits	92
2.1. Séparation des peptides par ultrafiltration	92
2.2. Simulation de la digestion gastro-intestinale	93
2.3. Analyse de l'impact de la digestion gastro-intestinale sur les fermentats	94
VII. Etude des activités biologiques des hydrolysats	95
1. Test de cytotoxicité.....	95
2. Inhibition de la dipeptidyl peptidase IV.....	95

2.1. Test biochimique	95
2.2. Test sur modèle Caco-2	96
3. Inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine.....	97
4. Stimulation de la sécrétion du glucagon-like peptide-1	98
5. Modulation de l'absorption du calcium	98
5.1. Etude de l'incorporation du calcium.....	98
5.2. Modulation de l'expression du transporteur du calcium.....	99
6. Prédiction des activités biologiques	100
VIII. Développement d'un procédé de production en continu	101
1. Procédés de fermentation en continu.....	101
2. Atomisation du produit de fermentation	103
IX. Réplicats et analyses statistiques.....	104
Chapitre 3 : Approche probiotiques	105
I. Introduction bibliographique.....	106
1. Microbiote intestinal et pathophysiologies liées au vieillissement	106
2. Les probiotiques, des organismes aux effets bénéfiques pour la santé	108
2.2. Généralités sur les probiotiques.....	108
2.2.1. Mise en évidence et définition des probiotiques	108
2.2.2. Les probiotiques en quelques chiffres	110
2.3. Du concept à l'effet métabolique.....	113
2.3.1. Maintien des fonctions et du métabolisme intestinal.....	113
2.3.2. Protection contre les pathogènes	117
2.3.3. Effets immunomodulateurs et impacts sur l'inflammation	117
2.3.4. Impacts sur le système nerveux.....	119
2.3.5. Absorption minérale et action sur le métabolisme osseux	119
3. La recherche de souches probiotiques.....	124
3.1. Les règles générales.....	124
3.2. La sélection selon l'activité biologique ciblée.....	129
3.3. La sélection selon les propriétés intrinsèques aux probiotiques	130
II. Objectifs.....	131
III. Résultats	132
1. Sélection de souches potentiellement probiotiques.....	132
1.1. Selon la tolérance à l'acidité.....	132
1.2. Selon l'hydrophobie pariétale.....	132
1.3. Combinaison des critères et sélection des souches	133
2. Les souches sélectionnées présentent différentes caractéristiques probiotiques	135
2.1. Génotypage des souches par REP-PCR.....	135
2.2. Les souches tolèrent la digestion gastro-intestinale.....	136
2.3. Innocuité des souches bactériennes vis-à-vis des cellules intestinales	137

2.4. Auto-agrégation et potentiels d'adhésion aux cellules intestinales	138
2.5. Sélection des souches pour la suite du projet	139
3. Impact des souches sur le métabolisme du calcium et de la vitamine D.....	140
3.1. Modulation du transport total et de l'incorporation du calcium par les souches	140
3.2. Modulation de différents gènes impliqués dans le transport du calcium ou la signalisation de la vitamine D	144
3.3. Différents impacts sur l'absorption du calcium sont mis en évidence.....	146
I.V. Discussion	147
Chapitre 4 : Approche peptides bioactifs	155
I. Introduction bibliographique.....	156
1. Les peptides bioactifs, des fragments aux effets multiples	156
1.1. Généralités sur les peptides bioactifs.....	156
1.2. Impacts sur le métabolisme	157
1.2.1. Effets sur l'homéostasie intestinale.....	158
1.2.2. Effets sur le système cardiovasculaire et l'inhibition de l'ACE.....	159
1.2.3. Effets sur le système immunitaire et la modulation des inflammations	160
1.2.4. Effets sur le système nerveux.....	161
1.2.5. Effets sur le système osseux.....	162
2. Stratégies de découverte et d'identification des peptides bioactifs.....	164
2.1. Approche conventionnelle	165
2.2. Approche bio-informatique	166
3. Applications et limites des peptides bioactifs	168
4. Le système protéolytique des Lactobacilles : producteur d'une grande variété de peptides.....	171
4.1. Description du système protéolytique.....	171
4.2. Différentes spécificités des CEPs vis-à-vis de l'hydrolyse des protéines.....	174
4.3. Une large variété possible de substrat de fermentation	175
5. La production de peptides bioactifs par les Lactobacilles : aspect pratique	176
5.1. Fonctionnalisation d'un produit alimentaire.....	176
5.2. Extraction des peptides à partir du milieu de fermentation	178
5.3. Utilisation de protéases pariétales partiellement purifiées.....	181
II. Objectifs.....	185
III. Résultats	186
1. Sélection de souches présentant d'importantes activités protéolytiques.....	186
2. Analyse multiparamétrique de cultures en lait écrémé	186
2.1. Première étape de l'analyse multiparamétrique.....	187
2.1.1. Comportements des souches après culture en lait écrémé.....	187
2.1.2. Analyse de l'ensemble des paramètres.....	189
2.2. Deuxième étape de l'analyse multiparamétrique.....	190
2.2.1. Distribution des gènes codant pour les protéases pariétales.....	190
2.2.2. Identification et analyse des peptides produits.....	191

2.2.3. Analyse des corrélations entre les CEPs détectés et les peptides produits	193
2.3. Sélection des souches pour la suite du projet	195
3. Production de laits fermentés par batch-fermentation en bioréacteur	195
4. Traitements et analyses des fermentats produits	199
4.1. Séparation des peptides par ultrafiltration	201
4.2. Digestion gastro-intestinale des produits de fermentation.....	203
4.3. Impact de la digestion gastro-intestinale sur l'hétérogénéité peptidique.....	206
4.4. Prédiction des séquences bioactives dans les produits digérés.....	211
5. Mesure <i>in vitro</i> des activités biologiques des hydrolysats	216
5.1. Cytotoxicité des hydrolysats peptidiques	216
5.2. Inhibition de la DPP-IV	217
5.3. Impact sur la stimulation de la sécrétion du GLP-1.....	220
5.4. Inhibition de l'ACE	222
5.5. Impact sur l'absorption du calcium	223
6. Mise au point d'un procédé de production en continu d'un hydrolysate d'intérêt	226
6.1. Fermentations en mode continu.....	226
6.2. Atomisation du produit de fermentation.....	232
6.3. Impact du produit final sur l'inhibition de l'ACE	234
I.V. Discussion	236
Chapitre 5 : Discussion générale	247
Chapitre 6 : Perspectives	256
I. Combinaison des approches, développement d'un yaourt ou lait fermenté bi-fonctionnel	257
II. Limites et challenges pour la production de peptides bioactifs par les Lactobacilles	259
III. Le futur des Lactobacilles en tant que probiotiques	261
Références bibliographiques	263
Valorisation scientifique.....	287

Liste des figures

Figure 1 : Structure anatomique des os.	22
Figure 2 : Lignées cellulaires impliquées dans le métabolisme osseux.....	24
Figure 3 : Représentation schématique du remodelage osseux.	25
Figure 4 : Représentation schématique des facteurs locaux du remodelage osseux.....	27
Figure 5 : Evolution de la masse osseuse avec l'âge.	28
Figure 6 : Evolution du syndrome ostéoporotique avec l'âge.	29
Figure 7 : Facteurs déterminants de la masse osseuse au cours de la vie.	30
Figure 8 : Interactions entre le métabolisme osseux et d'autres métabolismes du corps.	31
Figure 9 : Représentation schématique des relations existant entre la production de ROS, le syndrome métabolique et le vieillissement.	33
Figure 10 : Structure et organisation du proglucagon et des peptides dérivés.	34
Figure 11 : Modèle pathophysiologique de l'ostéodystrophie diabétique.	37
Figure 12 : Représentation schématique de la relation complexe entre le système immunitaire, la perte osseuse associée à la privation des œstrogènes et le microbiote intestinal.....	39
Figure 13 : Représentation schématique de l'absorption intestinale du calcium.	41
Figure 14 : Biosynthèse de la vitamine D.....	42
Figure 15 : Interaction de la PTH et de la vitamine D dans la régulation de la concentration du calcium dans le sang.	43
Figure 16 : La nouvelle vision du système rénine angiotensine.	46
Figure 17 : Causes et conséquences du syndrome métabolique.	52
Figure 18 : Des généralités sur les Lactobacilles.....	56
Figure 19 : Structure du kefir.....	60
Figure 20 : Origines des différents produits laitiers récoltés par la société VF Bioscience pour la constitution de la collection de souches.	66
Figure 21 : Abondance des espèces bactériennes (nombre d'isolats) dans la collection de souches isolées en Mongolie et identifiées par séquençage de l'ADNr 16S.	67
Figure 22 : Gélose au lait utilisée pour le criblage de la collection.....	70
Figure 23 : Représentation schématique de l'incorporation de la sonde fluorescente FluoForte par les cellules Caco-2.	78
Figure 24 : Représentation de la stratégie de criblage des souches de la collection.....	82
Figure 25 : Représentation schématique du système de fermentation en bioréacteur.....	90
Figure 26 : Représentation schématique du traitement d'ultrafiltration réalisé sur les fermentats bruts.	92
Figure 27 : Représentation schématique du procédé de fermentation en continu.	101
Figure 28 : Définition des probiotiques et produits associés.....	109
Figure 29 : Effets bénéfiques des probiotiques sur la santé selon l'ISAPP.	111
Figure 30 : Impacts de souches probiotiques sur l'intégrité d'épithélium intestinal.	114
Figure 31 : Impacts de souches probiotiques sur la régulation de l'homéostasie énergétique.	116
Figure 32 : Impacts de souches probiotiques sur l'absorption intestinale du calcium.....	121
Figure 33 : Effets de souches probiotiques sur le métabolisme osseux.....	123
Figure 34 : Règles pour l'évaluation de souches probiotiques.	124
Figure 35 : Stratégies de criblages pour la sélection de souches probiotiques.	128
Figure 36 : Pourcentages d'hydrophobie pariétale des souches de la collection en fonction de leur classe de tolérance à l'acidité.....	133

Figure 37 : Dendrogramme généré suite au regroupement des souches en fonction du génotypage par REP-PCR.....	135
Figure 38 : Concentrations en cellules bactériennes viables dans les 3 différents compartiments de la DGI simulée in vitro.....	136
Figure 39 : LDH libérée suite à un contact entre les souches bactériennes et les cellules intestinales Caco-2 et HT-29 MTX.....	137
Figure 40 : Evolution de la TEER et de la concentration en calcium dans le compartiment basal d'une monocouche de cellules Caco-2 au cours d'un contact avec les souches bactériennes.....	141
Figure 41 : Evolution de la concentration intracellulaire de calcium chez les cellules Caco-2 après injection de 25 μ L d'une solution de CaCl_2 (250 mM).	143
Figure 42 : Taux d'ARNm des 4 gènes étudiés chez les cellules HT-29 MTX après 24 h de contact avec les souches bactériennes.....	145
Figure 43 : Diagramme de Venn résumant les expérimentations en liens avec l'absorption du calcium réalisées sur cellules Caco-2 et HT-29 MTX avec les souches bactériennes.	146
Figure 44 : Mécanismes d'action des souches étudiées vis-à-vis de l'absorption du calcium par les cellules intestinales.....	152
Figure 45 : Production et fonctionnalités des peptides bioactifs.	156
Figure 46 : Effets physiologiques des peptides bioactifs sur différents systèmes.	158
Figure 47 : Impacts des peptides bioactifs sur le métabolisme osseux.....	163
Figure 48 : Stratégies de découverte et d'identification de peptides bioactifs.	164
Figure 49 : Le système protéolytique chez les Lactobacilles.	172
Figure 50 : Organisation structurale de différentes CEPs chez les Lactobacilles.	173
Figure 51 : Exemples de profils obtenus par SEC à partir des peptides extraits des cultures en lait écrémé.	188
Figure 52 : Analyse en composantes principales réalisée à partir des variables issues de la première étape de l'analyse multiparamétrique pour les 15 souches sélectionnées.	189
Figure 53 : Cartes de chaleur de la caséine β construites à partir des peptides identifiés par spectrométrie de masse.	192
Figure 54 : Analyse en composantes principales des cartes de chaleur construites à partir des peptides identifiés.	193
Figure 55 : Croissance des souches au cours de la fermentation du lait en mode batch.	196
Figure 56 : Production de peptides par les souches bactériennes au cours de la fermentation du lait en mode batch.	197
Figure 57 : Exemples de profils obtenus par SEC à partir des surnageants de culture au cours de la fermentation du lait en mode batch.	198
Figure 58 : Intégration différentielle des chromatogrammes obtenus après analyse par SEC des surnageants de culture au cours de la fermentation.....	199
Figure 59 : Concentrations peptidiques déterminées dans les 3 produits de fermentation (F45a, F49d et F60b) et dans le produit contrôle (FCtl).	200
Figure 60 : Représentation schématique des stratégies entreprises pour l'étude des activités biologiques des produits fermentés.....	201
Figure 61 : Profils obtenus par SEC à partir des perméats d'ultrafiltration des différents produits de fermentation.....	202
Figure 62 : Impact d'une digestion gastro-intestinale sur les concentrations peptidiques déterminées dans les perméats d'ultrafiltration des produits fermentés.	203
Figure 63 : Profils obtenus par SEC au cours de la digestion gastro-intestinale des produits issus de l'ultrafiltration des fermentâts.	204

Figure 64 : Impact d'une digestion gastro-intestinale sur les concentrations peptidiques déterminées dans les produits fermentés bruts.	205
Figure 65 : Profils peptidiques obtenus par SEC au cours de la digestion gastro-intestinale des produits fermentés bruts.	206
Figure 66 : Proportions de séquences peptidiques communes à la condition contrôle dans les produits fermentés bruts.	208
Figure 67 : Analyse en composantes principales des cartes de chaleur de la caséine β construites à partir des peptides identifiés dans les produits de fermentation.....	209
Figure 68 : Analyse en composantes principales issue de la comparaison des cartes peptidiques obtenues par spectrométrie de masse.....	210
Figure 69 : Nombre de séquences inhibitrices de la DPP-IV dans les différents produits bruts après digestion selon la base de données MBPDB.	212
Figure 70 : Nombres de séquences inhibitrices de l'ACE dans les différents produits selon la base de données MBPDB.	212
Figure 71 : Répartition des IC_{50} prédites pour les peptides identifiés dans les différents produits bruts digérés vis-à-vis de l'inhibition de la DPP-IV.	213
Figure 72 : Répartition des IC_{50} prédites pour les peptides identifiés dans les différents produits bruts vis-à-vis de l'inhibition de l'ACE.	215
Figure 73 : Pourcentages de cellules Caco-2 viables après un contact avec les différents produits fermentés.	217
Figure 74 : Inhibition de la DPP-IV par les différents produits fermentés digérés.	218
Figure 75 : Inhibition de la DPP-IV par les différents perméats d'ultrafiltration après digestion.....	219
Figure 76 : Inhibition de la DPP-IV, exprimée par les cellules Caco-2, par les différents produits fermentés digérés.....	220
Figure 77 : Effets des différents produits fermentés ou perméats digérés sur la sécrétion du GLP-1 actif par les cellules STC-1.....	221
Figure 78 : Effets des produits fermentés et de leurs perméats sur l'inhibition de l'ACE.	222
Figure 79 : Effets des produits fermentés et de leurs perméats sur l'incorporation du calcium par les cellules Caco-2.	224
Figure 80 : Effets des produits fermentés et de leurs perméats digérés sur l'expression du gène <i>trpv6</i> codant pour le transporteur du calcium.	225
Figure 81 : Présentation du bioréacteur à membrane et du montage pour le fonctionnement du procédé en continu.	226
Figure 82 : Croissance de la souche <i>L. helveticus 45a</i> au cours de la fermentation en mode continu dans un bioréacteur classique ou un bioréacteur à membrane.	227
Figure 83 : Evolution des concentrations en lactose et en acide lactique au cours de la fermentation du lait par la souche <i>L. helveticus 45a</i> en mode continu dans un bioréacteur classique ou dans un bioréacteur à membrane.	228
Figure 84 : Production de peptides par la souche <i>L. helveticus 45a</i> au cours de la fermentation en mode continu dans un bioréacteur classique ou un bioréacteur à membrane.....	229
Figure 85 : Intégrations des chromatogrammes obtenus par analyse SEC des surnageants de culture issus de la fermentation en bioréacteur à membrane.	230
Figure 86 : Impact de la concentration en maltodextrine sur le rendement d'atomisation du produit de fermentation.....	233
Figure 87 : Effets des produits de fermentation avant et après atomisation sur l'inhibition de l'ACE.	234
Figure 88 : Comparaison des IC_{50} obtenus avec les produits issus des fermentations en mode batch et en mode continu dans un bioréacteur à membrane.....	235

Figure 89 : Représentation schématique de la méthodologie proposée pour la sélection de souches de Lactobacilles en vue de la production de peptides bioactifs.	249
Figure 90 : Schéma récapitulatif des travaux réalisés, des résultats marquants et des souches mises en évidence.....	252

Liste des tableaux

Tableau 1 : Traitements actuels de l'ostéoporose, leurs mécanismes et inconvénients.	48
Tableau 2 : Exemples d'agents naturels exerçant un impact positif sur le métabolisme osseux.	53
Tableau 3 : Caractéristiques génomiques des principales espèces de Lactobacilles.	59
Tableau 4 : Amorces utilisées pour les expériences de qPCR.	81
Tableau 5 : Amorces utilisées pour la détection des gènes codant les CEP.	87
Tableau 6 : Composition chimique des fluides simulés de la digestion GI in vitro statique.	93
Tableau 7 : Microorganismes utilisés comme probiotiques.	110
Tableau 8 : Workflow pour la mise en évidence de souches probiotiques.	126
Tableau 9 : Tests utilisés pour l'étude in vitro de souches probiotiques.	127
Tableau 10 : Souches sélectionnées pour la suite du projet, sur bases de critères probiotiques.	134
Tableau 11 : Pourcentages d'auto-agrégation des cellules bactériennes après 2,5 et 5 h d'incubation dans un tampon PBS.	138
Tableau 12 : Pourcentage de cellules bactériennes adhérentes aux cellules intestinales Caco-2 après 2 h de contact.	139
Tableau 13 : Exemples de produits et ingrédients commercialisés dont l'activité revendiquée est due à des peptides bioactifs.	169
Tableau 14 : Méthodes de production de peptides bioactifs par utilisation des Lactobacilles : avantages et inconvénients.	183
Tableau 15 : Applications des peptides bioactifs produits par les Lactobacilles en fonction des différentes méthodologies de production.	184
Tableau 16 : Liste des souches sélectionnées suite au criblage de l'activité protéolytique sur gélose au lait.	186
Tableau 17 : Résultats de la première étape de l'analyse multiparamétrique.	187
Tableau 18 : Distribution des gènes codant pour les CEPs parmi les souches sélectionnées.	191
Tableau 19 : Souches sélectionnées suite à l'analyse multiparamétrique.	195
Tableau 20 : Concentrations en matière sèche après évaporation des perméats d'ultrafiltration obtenus à partir des produits fermentés.	202
Tableau 21 : Nombres de séquences peptidiques identifiées par spectrométrie de masse dans les produits fermentés bruts avant et après digestion gastro-intestinale.	207
Tableau 22 : Nombres moyens de séquences peptidiques identifiées par spectrométrie de masse dans les produits fermentés bruts avant et après digestion gastro-intestinale pour les protéines majoritaires du lait et la pepsine gastrique.	207
Tableau 23 : Nombres de séquences bioactives selon la base de données MBPDB dans les différents produits de fermentation bruts et digérés.	211
Tableau 24 : Comparaison des résultats obtenus à partir des 3 procédés de fermentation réalisés au cours du projet : le mode batch, le continu en bioréacteur classique (BRC) et le continu en bioréacteur à membrane (BRM).	231
Tableau 25 : Caractéristiques du produit issu de la fermentation par la souche <i>L. helveticus</i> 45a en mode continu avec recyclage totale des cellules (BRM).	232

Préambule

L'objectif de la thèse est la mise en évidence de souches de Lactobacilles utilisables pour la prévention de l'ostéoporose. Il s'agit d'une thèse CIFRE issue d'un partenariat entre l'institut Charles Viollette et l'entreprise VF Bioscience. L'institut Charles Viollette est un laboratoire de recherche régional en agro-alimentaire regroupant plusieurs structures de la région Hauts de France. Son but est d'étudier entre autres les aliments, de leur production à leur consommation en passant par leur caractérisation. L'entreprise VF Bioscience est une start-up créée en 2011 dont l'activité consiste à développer des ingrédients fonctionnels innovants ainsi que des compléments alimentaires.

En 2014, VF Bioscience a constitué une collection d'environ 170 souches de bactéries lactiques isolées en Mongolie, collection qui constitue la base de ce projet de thèse. L'élevage extensif d'ovins, caprins, bovins, équins et caméliens est une activité occupant une place importante en Mongolie. Cet élevage est pratiqué depuis des millénaires par des nomades pastoraux qui parcourent continuellement le territoire du fait des pâturages fragiles. Directement issus de cette activité traditionnelle, les produits laitiers fermentés sont parmi les plus emblématiques de la Mongolie. Ces produits peuvent être des laits fermentés ou des yaourts (tarag) et sont préparés à partir de différents laits tels que le lait de vache, chamelle, dri (femelle du yak), chèvre ou brebis. Le lait de jument est quant à lui exclusivement réservé à la production d'une boisson lactée alcoolisée (l'airag) qui a une forte valeur sociale et culturelle en Mongolie. Les nomades produisent ces aliments par une fermentation spontanée des laits récoltés et chaque famille a ses propres variantes de production. Ces pratiques diverses suggèrent une forte diversité microbiologique dans ces produits laitiers, justifiant l'initiation de ce projet de thèse.

A partir de la collection, deux approches ont été définies et sont restées indépendantes tout au long de la thèse, sont ainsi distinguées l'utilisation des souches en tant que probiotiques, et la production de peptides bioactifs par fermentation du lait. Ces deux stratégies permettant de développer différentes applications santé utilisables pour la prévention de l'ostéoporose. Outre les enjeux de santé et la nécessité de trouver des alternatives aux traitements des désordres métaboliques, la mise en évidence d'applications potentielles des souches de la collection constituée par VF Bioscience est un objectif majeur de ce projet de thèse.

Chapitre 1

Introduction générale

I. L'ostéoporose, définition en quelques chiffres

L'ostéoporose est caractérisée par une augmentation de la fragilité du squelette issue de la réduction de la quantité et/ou qualité du tissu osseux. Il s'agit d'une maladie métabolique liée à une perte lente et progressive de la masse osseuse au cours de la vie. Ce phénomène entraîne un risque de fracture plus élevé ainsi qu'une diminution de la qualité de vie.

Dans un contexte mondial où l'espérance de vie augmente en lien avec un vieillissement démographique de plus en plus important, la prévalence de l'ostéoporose s'accroît avec l'âge de la population. Toutes régions confondues, il est établi qu'une femme sur deux connaîtra une fracture liée à l'ostéoporose à un moment de sa vie ; il en est de même pour un homme sur cinq (Cosman *et al.*, 2014).

Dans le monde, le nombre de fractures liées à l'ostéoporose est d'environ 8,9 millions chaque année (Villa *et al.*, 2017), dont 2 millions rien qu'aux Etats-Unis (Cosman *et al.*, 2014). Ces fractures dégradent profondément la qualité de vie des sujets atteints, 50 % des personnes âgées ayant subies une fracture fémorale vont perdre leur indépendance et 20 % décéderont dans l'année suivante (D'Amelio & Sassi, 2018).

La plus grave conséquence de l'ostéoporose reste cependant une fracture de la hanche, qui cause de nombreuses complications telles que des douleurs chroniques, une invalidité, une qualité de vie amoindrie et un risque de mortalité accrue (Dhanwal *et al.*, 2011). En effet, une fracture de la hanche entraîne une augmentation de 8 à 36 % du risque de mortalité dans l'année qui suit et les sujets ont 2,5 fois plus de risques de faire d'autres fractures (Cosman *et al.*, 2014). Les prévisions pour les années à venir montrent que la prévalence de l'ostéoporose ne fera que croître. Tandis que l'incidence de fractures de la hanche était de 1,66 millions en 1990, ce chiffre devrait atteindre 6,26 millions en 2050 dont 50 % des fractures qui auront lieu sur le continent asiatique (Dhanwal *et al.*, 2011).

En 2010, 27,5 millions de personnes étaient atteintes d'un syndrome ostéoporotique et la maladie a entraîné le décès de 43.000 personnes. De plus, les prévisions montrent que 33,9 millions d'Européens souffriront d'une perte de masse osseuse conséquente en 2025 (Hernlund *et al.*, 2013). L'incidence de l'ostéoporose varie selon les pays considérés, la pathologie touche plus particulièrement les pays scandinaves, tandis qu'elle est moins fréquente en France, Suisse et Allemagne (Dhanwal *et al.*, 2011).

Cette prévalence accrue de l'ostéoporose conduit à une augmentation des coûts de santé en sachant que la maladie représente déjà un poids économique considérable pour la société. En Europe, les frais de santé liés à l'ostéoporose ont été évalués à 37 milliards d'euros en 2010 (Hernlund *et al.*, 2013). Aux Etats-Unis l'augmentation du coût des soins liés au traitement de l'ostéoporose et à la prise en charge des fractures est estimée à 25,3 milliards de dollars d'ici à 2025 (Cosman *et al.*, 2014).

Ces données montrent le poids conséquent de l'ostéoporose dans la société. De plus les prévisions concernant l'incidence de la pathologie et les conséquences associées soulignent l'urgence de trouver des solutions adaptées pour lutter contre son apparition.

II. L'ostéoporose, une conséquence de perturbations du métabolisme

L'ostéoporose est une maladie métabolique qui se traduit par des perturbations du remodelage osseux qui sont la conséquence de facteurs génétiques et environnementaux qui impactent l'ensemble du métabolisme et ainsi le maintien du système osseux.

1. Le métabolisme osseux

1.1. La composition du tissu osseux

Le tissu osseux présente plusieurs fonctions : la protection des organes et des fonctions biomécaniques et locomotrices. Il contient également les cellules hématopoïétiques précurseurs des cellules sanguines et immunitaires, et il exerce un rôle métabolique important dans le maintien de l'équilibre phosphocalcique, puisqu'il renferme 99 % du calcium et 90 % du phosphore de l'organisme.

Son architecture se distingue par deux sous types d'os (**Figure 1**) : l'os cortical (ou compact) représentant 80 % du squelette, constitue la paroi externe de toute pièce osseuse ainsi que la diaphyse des os longs.

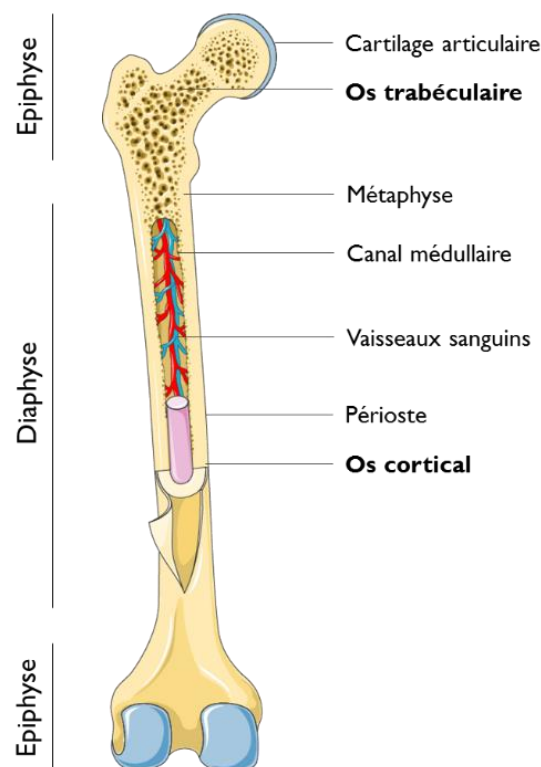


Figure 1 : Structure anatomique des os.
Image d'après Servier Medical Art.

Cet os est fortement calcifié et assure des fonctions de structure et de protection. L'os trabéculaire (ou spongieux) représente 20 % du squelette, il est beaucoup moins calcifié mais extrêmement vascularisé, il représente ainsi une surface d'échange considérable avec les liquides interstitiels et se renouvelle plus rapidement que l'os cortical. Il assure la fonction métabolique des os mais également biomécanique, participant notamment à la résistance aux contraintes mécaniques.

Le tissu osseux est un tissu conjonctif hautement spécialisé, il comprend une matrice osseuse elle-même constituée d'une fraction organique et d'une fraction minérale, ainsi que des cellules osseuses des lignées ostéoblastiques et ostéoclastiques.

La matrice osseuse se compose d'une fraction organique constituée majoritairement de fibres de collagènes (90 %). Ces fibres sont associées à d'autres protéines non collagéniques (PNCs) ainsi qu'à des protéines d'origine plasmatique et des facteurs de croissance. Les PNCs représentent 10 % de la fraction organique des os et font partie intégrante de la matrice osseuse, la plus connue étant l'ostéocalcine. Les protéines d'origine plasmatique sont synthétisées dans d'autres organes mais s'accumulent dans les os à partir du plasma et des liquides interstitiels, l'albumine en est un exemple. Enfin on retrouve également des facteurs de croissance qui s'accumulent dans les tissus osseux et notamment le facteur de croissance transformant β (Transforming Growth Factor β , TGF- β), ou encore des membres de la famille des facteurs de croissance similaire à l'insuline (Insulin Like Growth Factors, IGFs). La fraction organique du tissu osseux est majoritairement synthétisée par les ostéoblastes, une fois formée elle se minéralise pour former la matrice osseuse. La fraction minérale des os se forme au niveau de sites de nucléation localisés sur des zones particulières des fibres de collagène conduisant à la formation de cristaux d'hydroxyapatite de calcium ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Les ostéoblastes sont également responsables de la minéralisation osseuse notamment via la production de la phosphatase alcaline, participant à la libération du phosphate extracellulaire vers les sites de minéralisation.

Les cellules osseuses trouvent leur origine dans la moelle qui produit deux grands groupes de cellules souches. Les cellules souches de la lignée hématopoïétique vont donner les cellules sanguines et immunitaires dont la lignée monocyte-macrophage à l'origine des ostéoclastes. Les cellules souches mésenchymateuses ou stromales sont à l'origine des fibroblastes, des adipocytes, des cellules endothéliales et de la lignée ostéoformatrice (ostéoblastes et chondroblastes) (**Figure 2**).

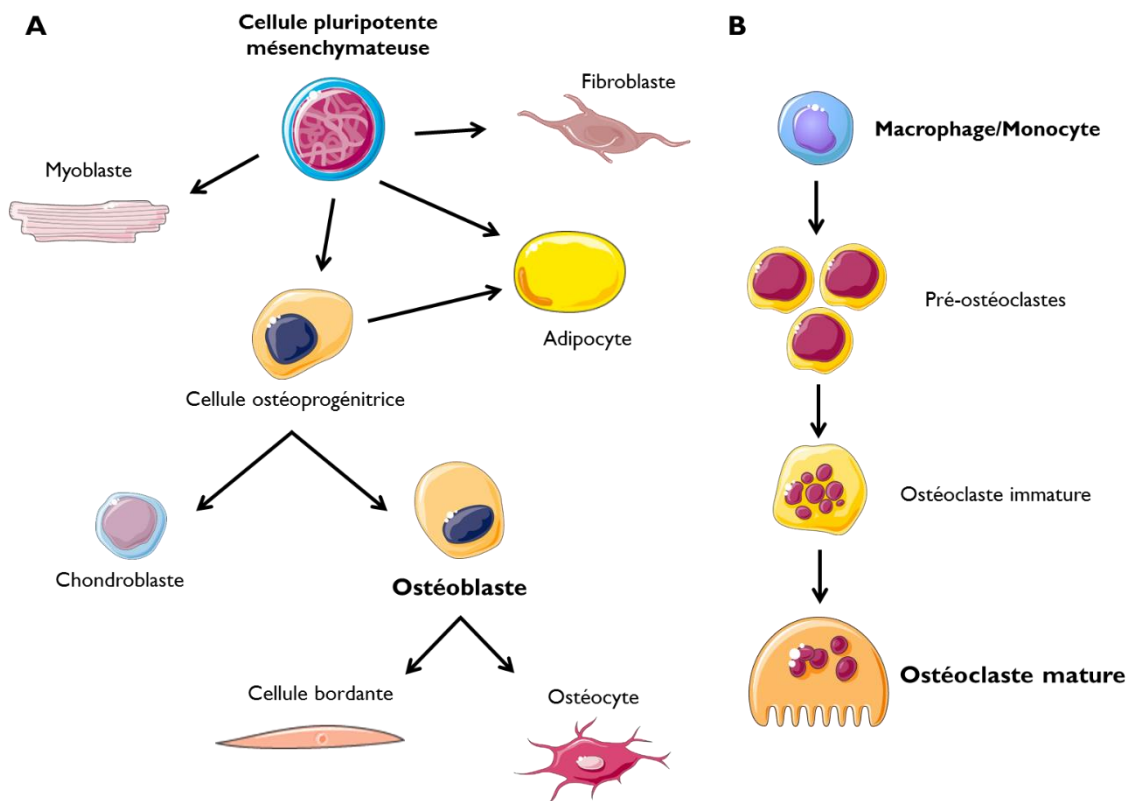


Figure 2 : Lignées cellulaires impliquées dans le métabolisme osseux.

A : Lignée hématopoïétique à l'origine des ostéoblastes.

B : Lignée monocyte/macrophage à l'origine des ostéoblastes.

Les ostéoclastes sont des cellules issues de la fusion de pré-ostéoclastes mononuclés. Un ostéoclaste mature est donc une cellule géante multinucléée et se caractérise par la présence de phosphatase acide contenue dans de nombreux lysosomes, de récepteurs à la calcitonine et par sa capacité à résorber la matrice osseuse minéralisée. Le pôle basal de la cellule présente une membrane plissée appelée bordure en brosse au contact de laquelle la matrice est résorbée (Soyza & Alles, 2016).

Les ostéoblastes matures sont des cellules mononucléées plus petites et caractérisées par une activité phosphatase alcaline importante, elles sont capables de synthétiser la matrice osseuse et de participer à sa minéralisation. Au fur et à mesure que la matrice est formée, les ostéoblastes deviennent moins actifs et s'aplatissent pour finalement s'incorporer dans le tissu et devenir des ostéocytes ou alors pour former des cellules bordantes. En effet, une partie des ostéoblastes matures peut se retrouver emmurée dans la matrice minéralisée, ces cellules deviennent alors des ostéocytes. Les cellules bordantes sont quant à elles des ostéoblastes devenus progressivement aplatis pour former une couche cellulaire le long des surfaces osseuses. Le rôle

des ostéocytes et des cellules bordantes n'est pas encore complètement élucidé, mais ces cellules participent à la transmission de diverses informations chimiques et mécaniques via des jonctions communicantes intercellulaires (Feng *et al.*, 2015; Marie & Cohen-Solal, 2018).

1.2. Le remodelage osseux

Le squelette est en perpétuel renouvellement, environ 5 à 10 % du tissu osseux est complètement renouvelé chaque année. Le remodelage osseux accomplit trois fonctions principales : il permet à l'organisme de réguler l'homéostasie du calcium et du phosphate, il constitue également un mécanisme d'adaptation du squelette à son environnement mécanique, réduisant ainsi le risque de fracture et il permet le renouvellement des tissus et la réparation des dommages osseux (Kenkre & Bassett, 2018). Ce phénomène est la conséquence de l'activité de plusieurs types cellulaires agissant de manière séquentielle. En résumé les ostéoclastes résorbent l'os ancien puis les ostéoblastes apposent une matrice ostéoïde qui se minéralisera (Figure 3).

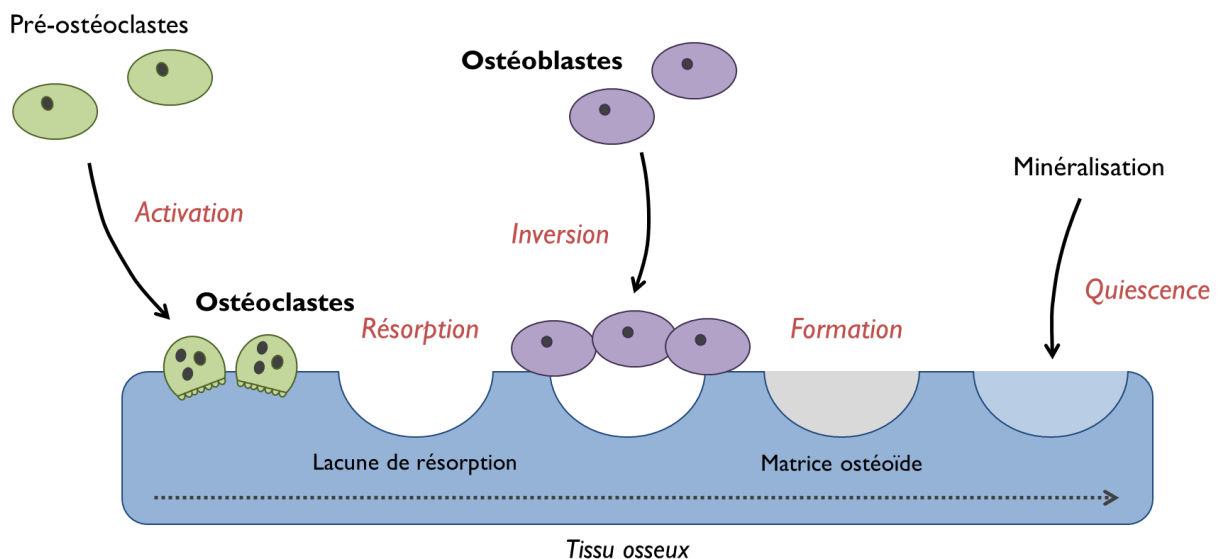


Figure 3 : Représentation schématique du remodelage osseux.

Les 5 phases du remodelage osseux sont représentées successivement (de gauche à droite) : l'activation des ostéoclastes, la résorption de la matrice osseuse, la phase d'inversion, la formation de la nouvelle matrice et la quiescence au cours de laquelle a lieu la minéralisation du tissu.

Le remodelage débute par une activation des cellules bordantes qui recouvrent une surface osseuse inactive. En se rétractant ces cellules dégradent la couche collagénique et attirent par chimiotactisme les pré-ostéoclastes sur la zone osseuse concernée, ceci constituant la phase d'activation. Par la suite, les pré-ostéoclastes fusionnent pour devenir des ostéoclastes actifs qui adhèrent à la surface osseuse, conduisant à la formation d'une poche hermétique entre la bordure en brosse des cellules et l'os. Au sein de cette poche, les ostéoblastes sécrètent des ions H^+ ainsi que des enzymes lysosomiales telles que la cathepsine K et des métalloprotéases ce qui entraîne une dissolution de la matrice minérale du tissu osseux également appelée phase de résorption. L'os résorbé laisse ainsi place à une lacune de résorption (ou lacune de Howship). La phase d'inversion correspond au remplacement des ostéoclastes par les ostéoblastes qui comblent la lacune et y apposent une nouvelle matrice organique qui sera par la suite minéralisée pendant la phase de formation. Vient ensuite une phase de quiescence (ou terminale) pendant laquelle la minéralisation de la matrice est finalisée.

1.3. Les facteurs locaux de régulation du remodelage osseux

Le remodelage osseux est régulé par de nombreux facteurs endogènes et exogènes. Il existe une régulation dite locale impliquant des acteurs présents au sein du tissu osseux, et une régulation systémique liée à d'autres métabolismes du corps humain.

Les facteurs locaux du remodelage osseux sont essentiellement produits par les ostéoblastes. La régulation principale du remodelage est dépendante du système constitué du ligand au récepteur activateur du facteur nucléaire κB (Receptor Activating Nuclear factor κB - Ligand, RANK-L) et de l'ostéoprotégérine (OPG) (Chen *et al.*, 2018b; Walsh, 2015). Ils jouent un rôle de médiateur de la communication intercellulaire entre les ostéoblastes et les ostéoclastes et sont essentiels à l'ostéoclastogénèse. La plupart des hormones et cytokines modulant la résorption osseuse agissent au moins en partie à travers cette voie. RANK-L est une cytokine synthétisée par les ostéoblastes capable d'activer le récepteur RANK exprimé par les cellules de la lignée ostéoclastique. Ceci constitue l'étape essentielle non seulement pour la différenciation des pré-ostéoclastes en cellules matures mais également pour le maintien de leur activité et la prolongation de leur durée de vie par inhibition de l'apoptose. A l'inverse, l'OPG est une glycoprotéine également produite par les ostéoblastes qui agit comme un récepteur soluble capable de piéger RANK-L et ainsi d'inhiber son activité. C'est donc le ratio entre le niveau d'expression de RANK-L et celui de son récepteur piège l'OPG, qui contrôle la résorption ostéoclastique, en résumé ce sont les ostéoblastes qui contrôlent le niveau de stimulation des ostéoclastes (**Figure 4**).

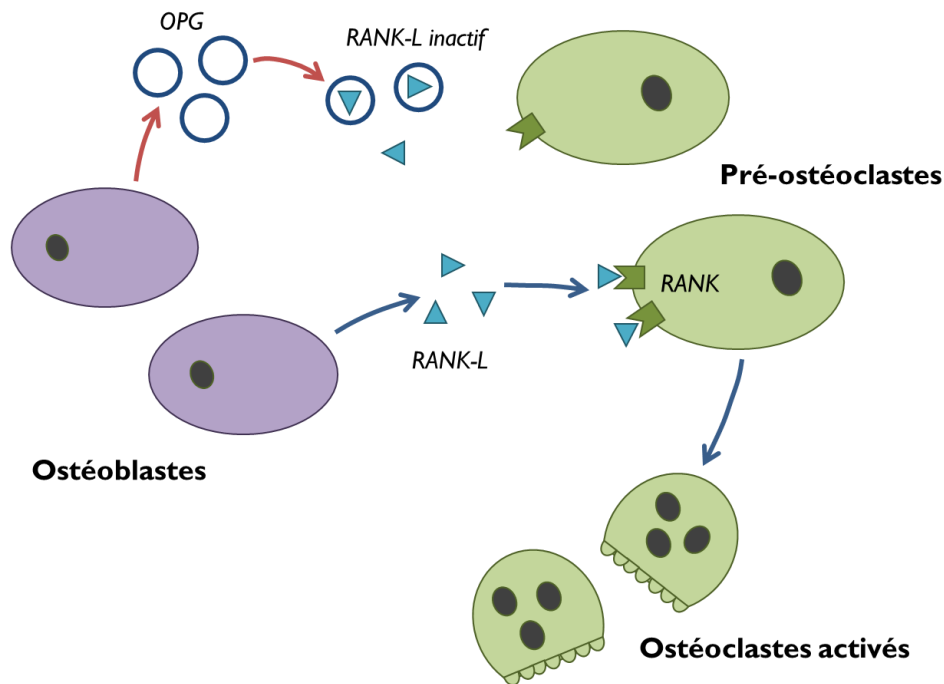


Figure 4 : Représentation schématique des facteurs locaux du remodelage osseux. Ces facteurs incluent le récepteur RANK et son ligand RANK-L permettant l'activation des ostéoclastes, l'OPG contrebalance cette activation en piégeant RANK-L. OPG : Ostéoprotégérine, RANK : Receptor Activating Nuclear Factor κ B, L : Ligand.

En tant que facteur de croissance le plus abondamment stocké dans les os, le TGF- β joue également un rôle dans la régulation endogène du remodelage osseux. Il est impliqué dans les phénomènes de cicatrisation où il agit notamment comme un facteur chimiotactique recrutant les ostéoblastes aux sites de réparation et d'inflammation. Son action est également inhibitrice de la formation et de l'activation des ostéoclastes par l'inhibition de leur prolifération ou par stimulation de l'apoptose. Les protéines osseuses morphogénétiques (Bone Morphogenetic Proteins, BMPs) sont également des facteurs endogènes, permettant d'induire la différenciation des ostéoblastes, les plus connues étant BMP-2, -4 et -7. De la même manière, les IGFs sont impliqués dans la stimulation et la différenciation des ostéoblastes. Enfin, les prostaglandines synthétisées par les ostéoblastes ont des effets variables sur le métabolisme osseux avec des effets stimulateurs ou inhibiteurs de la formation et de la résorption osseuse. La principale prostaglandine synthétisée, PGE₂, stimule l'activité de résorption en augmentant la prolifération des précurseurs ostéoclastiques (Walsh, 2015).

2. Le déclin du remodelage osseux conduisant à l'ostéoporose

La masse osseuse est la résultante de la taille des os et de leur densité minérale, elle évolue continuellement au cours de la vie et suit le fonctionnement du remodelage osseux (**Figure 5**).

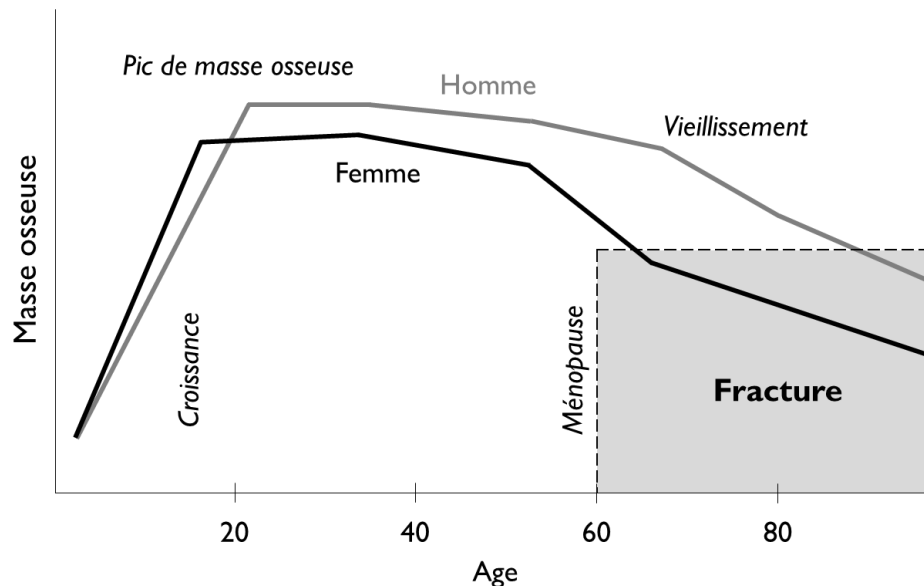


Figure 5 : Evolution de la masse osseuse avec l'âge.
D'après Harvey *et al.*, (2014).

En effet, la succession des phases de formation et de résorption des os conditionne le capital osseux du corps humain (Harvey *et al.*, 2014; Lanham-New, 2008; Manolagas, 2014). De la naissance à l'adolescence, la masse osseuse augmente au fur et à mesure de la croissance, ainsi la formation osseuse prédomine sur la résorption durant cette période de la vie. Par la suite, vers 25 à 30 ans, un pic de masse osseuse est observé, à cet instant, le remodelage osseux atteint un équilibre entre la formation et la résorption des os conduisant à un maintien global de la masse osseuse (Harvey *et al.*, 2014). Cet état d'équilibre est bref car la masse osseuse va progressivement diminuer à partir de 35-40 ans, ceci lié à un déséquilibre progressif du remodelage osseux où la résorption va de plus en plus prédominer sur la formation osseuse. Ce déclin est plus ou moins important selon les individus en fonction de différents facteurs exogènes et endogènes (Walsh, 2015). Chez les femmes, la privation des œstrogènes associée à la ménopause est un puissant perturbateur du remodelage osseux entraînant une accélération brutale de la perte osseuse (Tou, 2014).

Dans ce contexte, l'ostéoporose se traduit lorsque la masse osseuse atteint un certain seuil à partir duquel la pathologie est déclarée. En effet, l'excès de résorption du squelette conduit à une détérioration structurale des os et une augmentation de leur fragilité. Histologiquement, les sites de résorption sont incomplètement reformés lors du remodelage, ce qui entraîne une porosité des os plus élevée et une perte progressive de masse osseuse (**Figure 6**). L'ostéoporose peut toucher plus particulièrement les os trabéculaires du fait de leur importante surface d'échange, néanmoins les os corticaux sont également affectés, leur forte porosité rendant le risque de fractures plus élevé (Kenkre & Bassett, 2018).

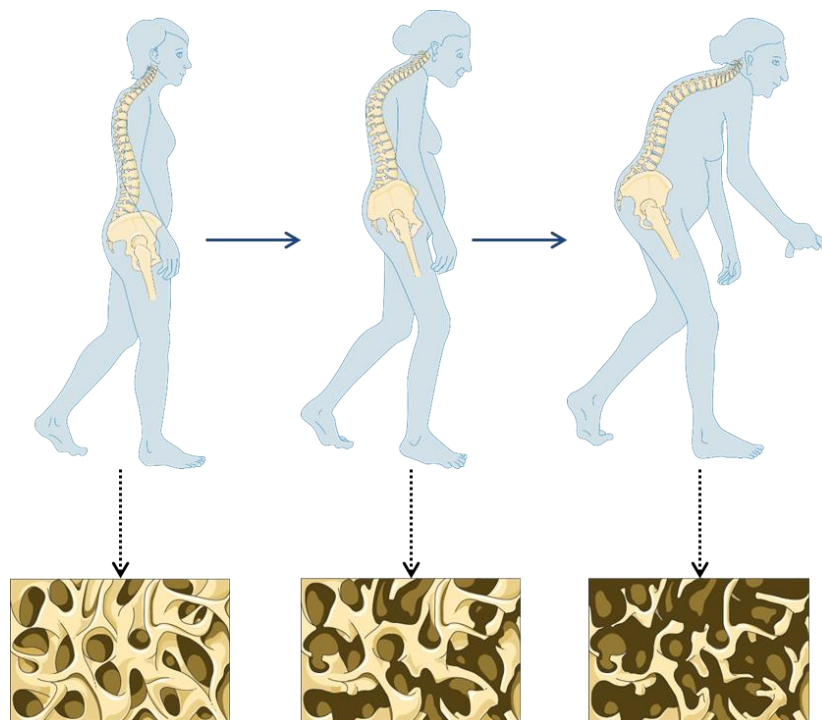


Figure 6 : Evolution du syndrome ostéoporotique avec l'âge.
Au cours du vieillissement, la porosité des os augmente tandis que la masse osseuse diminue perturbant la structure générale du squelette.

Les déterminants de la masse osseuse et *in fine* de l'ostéoporose sont nombreux, la constitution de la masse osseuse est déterminée par des facteurs génétiques et hormonaux tandis que la perte progressive de masse osseuse est influencée par l'alimentation, l'exercice physique, l'environnement (tabagisme, alcoolisme), mais également les hormones (**Figure 7**). Ces facteurs peuvent conduire à une perturbation du métabolisme global d'un individu impactant en retour le remodelage du tissu osseux. Ainsi l'ostéoporose est une pathologie multifactorielle liée à des perturbations du métabolisme dont les causes sont multiples.

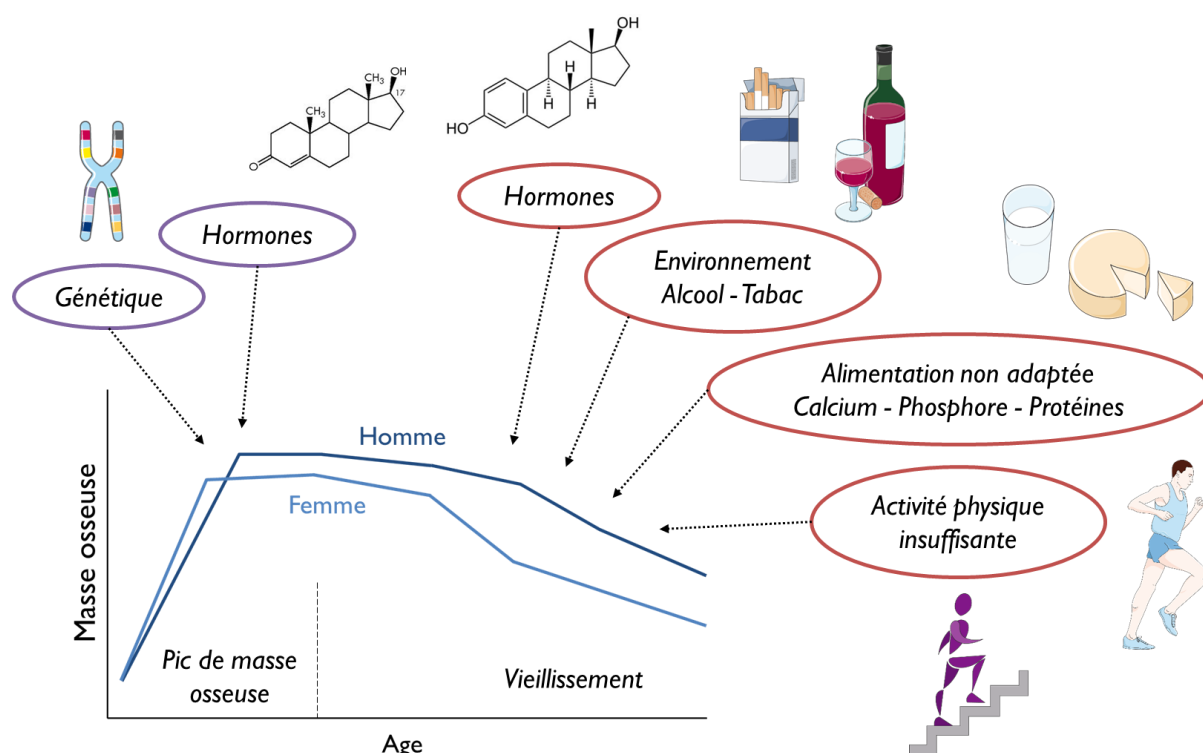


Figure 7 : Facteurs déterminants de la masse osseuse au cours de la vie.

En violet, les facteurs contrôlant le pic de masse osseuse, en rouge, les facteurs conduisant au déclin progressif de la masse osseuse au fur et à mesure du vieillissement.

3. Les liens avec d'autres métabolismes

Comme décrit précédemment, le remodelage osseux est régulé par des facteurs locaux et systémiques. Ces facteurs systémiques sont nombreux et impliqués dans le maintien du bon fonctionnement du remodelage osseux au cours de la vie. Ils sont associés au métabolisme général du corps impliquant tous les organes et fonctions de l'organisme (**Figure 8**).

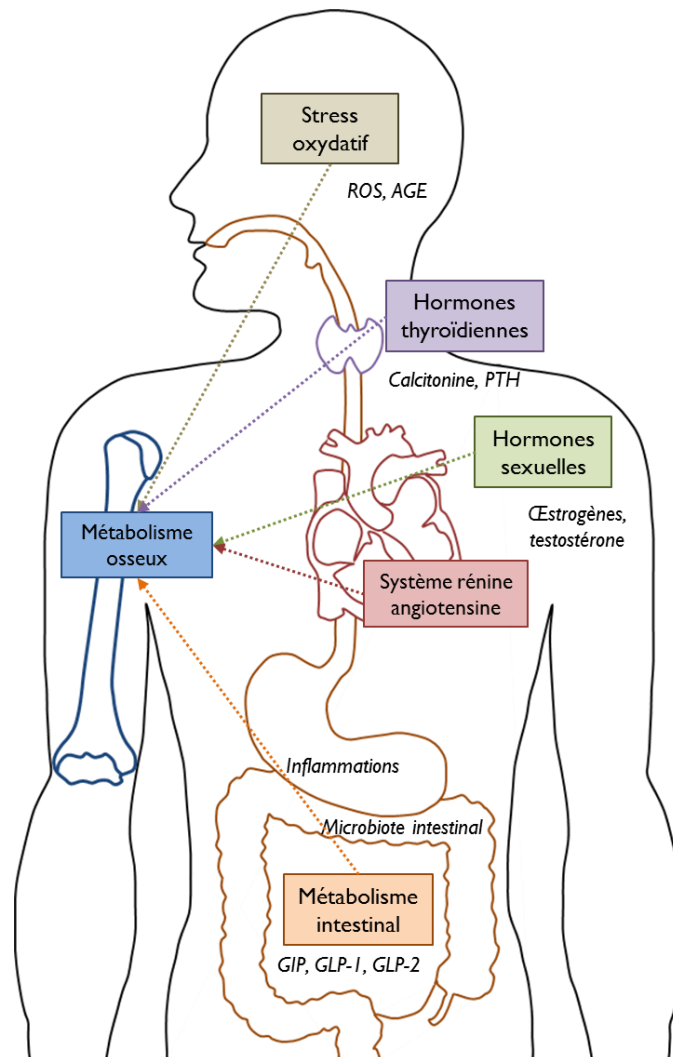


Figure 8 : Interactions entre le métabolisme osseux et d'autres métabolismes du corps.

Ces métabolismes incluent : le stress oxydatif, les hormones thyroïdiennes et sexuelles, le système rénine angiotensine et enfin le métabolisme intestinal.

3.1. Les hormones sexuelles

Parmi les hormones ayant un impact sur le système osseux, les hormones sexuelles et en particulier les œstrogènes, sont les principaux régulateurs endocriniens du remodelage osseux et ceci indépendamment du sexe. Ces hormones agissent via les récepteurs aux œstrogènes (Estrogens Receptor, ER) exprimés par certaines cellules osseuses. Les ostéoblastes sont la cible des œstrogènes entraînant une inhibition de l'ostéoclastogénèse médiée par l'inhibition de la synthèse de RANK-L et la stimulation de la sécrétion de l'OPG. Les œstrogènes peuvent également agir directement sur les ostéoclastes en stimulant leur apoptose (Walsh, 2015). Ainsi, la privation des œstrogènes à la ménopause induit une perte osseuse responsable de l'ostéoporose post-ménopausique touchant près d'un quart des femmes (Tou, 2014). Chez l'homme, où la synthèse d'œstrogènes est réalisée à partir de la testostérone, le taux hormonal diminue progressivement au cours du vieillissement (Stathopoulos *et al.*, 2014).

La testostérone est, dans une moindre mesure, également impliquée dans la régulation du remodelage osseux. Elle agit via les récepteurs aux androgènes exprimés par les cellules osseuses et permet une stimulation de la formation osseuse et une inhibition de la résorption via des mécanismes similaires à ceux des œstrogènes. La testostérone intervient particulièrement lors de la croissance du squelette, contrôlant la formation du pic de masse osseuse, ce qui explique les différences de masse osseuse constatées entre les hommes et les femmes (Walsh, 2015). Au cours du vieillissement, le taux de testostérone diminue d'environ 10 % par décennie chez l'homme réduisant progressivement son effet d'anti-résorption des os (Stathopoulos *et al.*, 2014).

En résumé, indépendamment du sexe, la diminution brutale ou progressive des hormones sexuelles au cours du vieillissement constitue un des facteurs conduisant au déséquilibre du remodelage osseux. Ces hormones sont en effet capables d'inhiber la résorption osseuse en agissant sur les ostéoblastes.

3.2. Le stress oxydatif

Généralement, le stress oxydatif est décrit par un déséquilibre entre les pro- et les antioxydants. Ce stress a tendance à inciter la résorption osseuse par une stimulation de la différenciation et de la fonction des ostéoclastes, conférant au stress oxydatif un impact significatif sur le développement de l'ostéoporose (Parvaneh *et al.*, 2014). Les mitochondries produisent des espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species, ROS) qui altèrent le métabolisme cellulaire. L'activation des ostéoclastes est régulée par différentes signalisations moléculaires,

les ROS peuvent notamment stimuler directement la différenciation cellulaire ou l'expression de RANK entraînant l'activation des ostéoclastes (Dudarić *et al.*, 2015).

Il existe de multiples causes à l'accumulation de ROS qui sont généralement associées au syndrome métabolique, aux perturbations du système cardiovasculaire ou à une résistance à l'insuline qui sont des exemples de phénomènes conduisant à un stress oxydatif (**Figure 9**) (Bonomini *et al.*, 2015; Kassi *et al.*, 2011; Shanbhogue *et al.*, 2015).

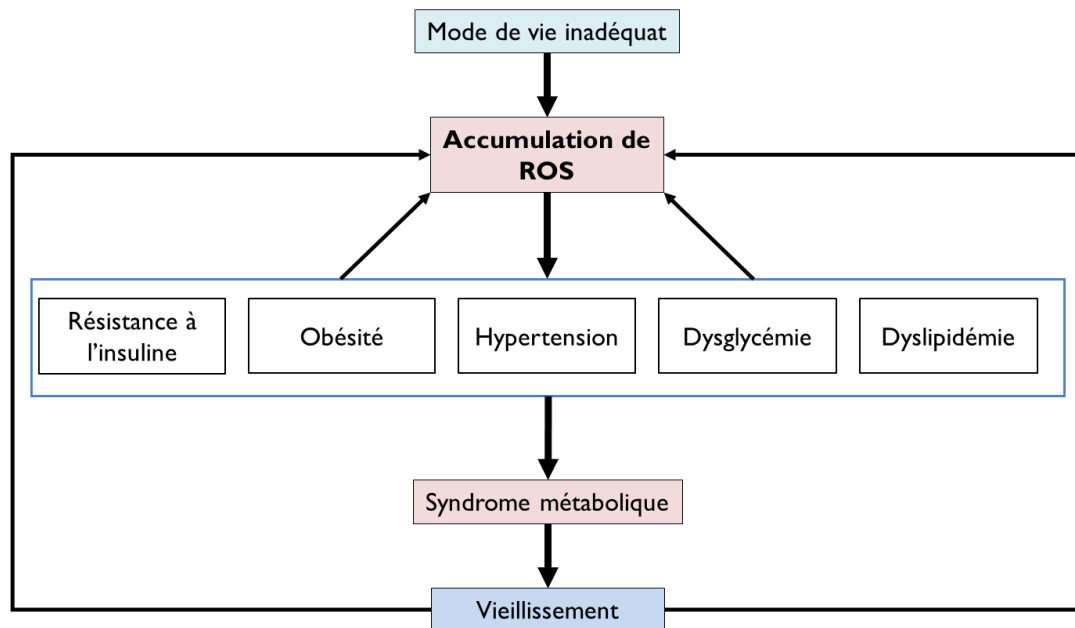


Figure 9 : Représentation schématique des relations existant entre la production de ROS, le syndrome métabolique et le vieillissement.

L'accumulation de ROS au cours de la vie contribue à différents syndromes favorisant le syndrome métabolique et *in fine*, le vieillissement.

ROS : Reactive Oxygen Species.

D'après Bonomini *et al.*, (2015).

Au cours de la vie, on observe une accumulation d'adipocytes dans le tissu osseux, en particulier au niveau de la moelle, cette accumulation conduit à un stress oxydatif du fait d'une susceptibilité plus élevée à l'oxydation des lipides (Manolagas, 2014; Tou, 2014). Les produits avancés de glycation (Advanced Glycation End products, AGEs) sont le fruit d'une glycation non enzymatique des protéines, formés inévitablement au cours du vieillissement, leur accumulation excessive peut causer des dommages aux tissus notamment via la génération de ROS (Sanguineti *et al.*, 2014; Shanbhogue *et al.*, 2015).

Ainsi le stress oxydatif est un phénomène ayant de multiples causes qui a tendance à s'amplifier avec l'âge. En excès, il perturbe le tissu osseux en particulier en stimulant la différenciation et l'activité des ostéoclastes qui favorisent la résorption osseuse.

3.3. Les impacts de l'intestin et du métabolisme énergétique

Considéré comme le deuxième cerveau, l'intestin est un organe aux nombreuses fonctions capables d'impacter l'ensemble du corps humain dont le système osseux. Il constitue très souvent le point de départ d'une signalisation métabolique pouvant avoir des conséquences dans d'autres parties du corps. Des fonctions telles que l'absorption des nutriments, les sécrétions hormonales ou les réponses immunitaires réalisées par l'intestin, constituent des phénomènes pouvant impacter le tissu osseux.

3.3.1. L'implication des hormones intestinales

Les hormones incrétines constituent un groupe d'hormones de nature peptidique ayant un effet insulinothèque, les plus connus sont le peptide insulinothèque dépendant du glucose (Glucose-dépendant Insulinothèque Polypeptide, GIP), le glucagon-like peptide-1 (GLP-1) et le GLP-2. Ces hormones sont sécrétées par les cellules endocrines de l'intestin en réponse à la prise alimentaire.

Le GLP-1 et le GLP-2 sont synthétisés à partir du proglucagon, une molécule de 158 acides aminés contenant les séquences du glucagon, du GLP-1 et du GLP-2 (**Figure 10**).

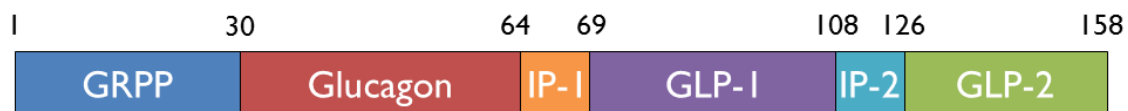


Figure 10 : Structure et organisation du proglucagon et des peptides dérivés.

GRPP : Glicentin Related Pancreatic Peptide, IP : Intervening Peptide, GLP : Glucagon Like Peptide.

D'après Sinclair *et al.*, (2013).

Ces derniers étant libérés lors d'une modification post-traductionnelle de la prohormone. Les enzymes impliquées dans cette modification post-traductionnelle alternative sont des pro-convertases (PCs), leur activité permet d'assurer l'activation du GLP-1 ou du GLP-2 aux endroits appropriés. Dans les cellules alpha du pancréas, la PC2 libère le glucagon actif tandis que dans les cellules entéroendocrines de l'intestin, les PC1 et 3 conduisent à une libération majoritaire de GLP-1 et de GLP-2. Le GIP est quant à lui issu du proGIP également clivé par les PC1 et 3 pour libérer sa forme active dans les cellules entéroendocrines (Ramsey & Isaacs, 2017; Sinclair & Drucker, 2013).

Ces hormones sont sécrétées suite à différents stimuli liés à la prise alimentaire, le GLP-1 et le GLP-2 ont une sécrétion induite par le glucose, le fructose, les peptides et acides aminés dérivés de la digestion des protéines et les acides gras, tandis que la sécrétion de GIP est induite par l'ingestion de glucose, de protéines et principalement de matières grasses. De plus, d'autres molécules non alimentaires sont capables de stimuler la sécrétion des hormones intestinales à savoir les acides biliaires et les acides gras à chaînes courtes (Short Chain Fatty Acids, SCFAs). Suite à leur sécrétion, l'action des hormones est médiée par interactions avec leurs récepteurs. Le GIP et le GLP-1 sont notamment impliqués dans la stimulation de la sécrétion d'insuline et/ou dans l'inhibition de la sécrétion du glucagon, cela afin de maintenir l'homéostasie du glucose (Ramsey & Isales, 2017; Reed & Wickham, 2009). De plus, le GLP-1 est impliqué dans la régulation de la prise alimentaire en induisant à court terme des signaux de satiété diminuant l'appétit (Caron *et al.*, 2015). Le GLP-2 a un effet protecteur sur l'épithélium intestinal, diminuant la perméabilité intestinale et améliorant l'absorption des nutriments (Sinclair & Drucker, 2013).

Ces hormones intestinales sont rapidement dégradées par l'action d'une aminopeptidase, la dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV). Il s'agit d'une enzyme ubiquitaire retrouvée sous forme soluble et sous une forme transmembranaire localisée dans de nombreux tissus. Elle clive les deux acides aminés retrouvés en position N terminale de ces hormones intestinales conduisant à une réduction, voire suppression de leurs activités biologiques (Caron *et al.*, 2015).

De par son action sur l'homéostasie du glucose, le GLP-1 constitue une cible thérapeutique pour lutter contre le diabète de type 2, diabète caractérisé par une réduction de la sensibilité des cellules des muscles et du foie à l'insuline et donc souvent une hyper-insulinémie et une hyperglycémie. Dans ce but, différentes stratégies sont envisagées, la découverte d'agonistes du récepteur au GLP-1 permettant d'accroître l'action de l'hormone sur la sécrétion d'insuline (Ramsey & Isales, 2017) ou l'inhibition de la DPP-IV afin d'empêcher l'inactivation du GLP-1 par l'enzyme (Godinho *et al.*, 2015).

En outre, les effets des hormones intestinales sur les os sont multiples et constituent un axe de signalisation entéro-osseux (Ramsey & Isales, 2017; Sinclair & Drucker, 2013). Le récepteur du GIP est exprimé par les ostéoblastes et les ostéoclastes matures, il a ainsi des effets anaboliques et cataboliques sur le tissu osseux. La stimulation des ostéoblastes par le GIP entraîne une augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline ainsi que de l'expression du collagène, il permet également de prévenir l'apoptose des ostéoblastes. Le GIP est également capable d'agir directement sur les ostéoclastes pour inhiber leur activité. Le récepteur du GLP-

1 est exprimé par les ostéoblastes matures et immatures, de nombreuses études ont également démontré l'impact du GLP-1 sur le bien-être du métabolisme osseux. En effet, des agonistes du récepteur au GLP-1 sont capables d'induire la formation osseuse ainsi que de prévenir les fractures osseuses. Une étude *in vivo* a d'ailleurs démontré l'impact d'un agoniste du GLP-1 (l'exendine-4) sur la promotion de la différenciation des ostéoblastes conduisant à une augmentation de la masse osseuse (Xue *et al.*, 2016). Le mécanisme d'action du GLP-2 sur les os est encore mal connu à ce jour, des études *in vivo* ont montré un impact positif d'une administration de GLP-2 sur la formation osseuse et sur la densité minérale osseuse (Bone Mineral Density, BMD) (Walsh, 2015).

Comme pour le diabète de type 2, le GLP-1 constitue une cible thérapeutique pour le maintien du métabolisme osseux. Le développement d'agonistes au récepteur du GLP-1 semble donc une approche prometteuse pour lutter à la fois contre le diabète de type 2 et l'ostéoporose (Ramsey & Isales, 2017). De la même manière l'utilisation d'inhibiteurs de la DPP-IV peut également s'avérer bénéfique pour la santé des os, ce qui a déjà été montré au cours d'une étude clinique (Barchetta *et al.*, 2016).

En réalité, en tant que maladies métaboliques, l'ostéoporose et le diabète de type 2 sont étroitement liées. En effet, chez les patients atteints de diabète de type 2, l'occurrence des fractures est plus élevée de 64 %. Néanmoins, aucune différence significative n'a été observée entre les sujets sains et les diabétiques au niveau de la BMD, ce qui suggère que le diabète de type 2 et ses conséquences affectent en particulier la microstructure des os et non leur composition (Shanbhogue *et al.*, 2015). Ces modifications du tissu osseux dues au diabète de type 2 portent le nom d'ostéodystrophie diabétique ce phénomène a d'ailleurs été reconnu lors du premier symposium international sur le diabète et les os (First International Symposium on Diabetes and Bone) en novembre 2014 à Rome (Epstein *et al.*, 2016). Les travaux de Shanbhogue *et al.*, (2015) ont permis de proposer un modèle expliquant sa pathophysiologie (**Figure 11**). En résumé, une augmentation de la résistance à l'insuline conduit à des effets variables sur les os à court terme.

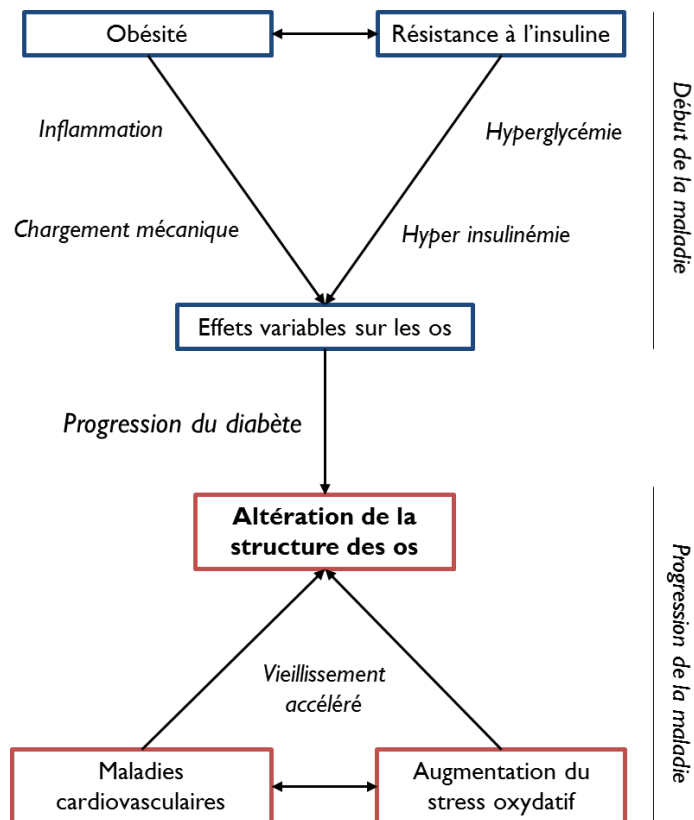


Figure 11 : Modèle pathophysiologique de l'ostéodystrophie diabétique.

Ce modèle montre les liens entre la résistance à l'insuline et ses effets sur les os. La progression du diabète conduit à une altération de la structure des os, elle-même perturbée par le stress oxydatif ou les maladies cardiovasculaires.

D'après Shanbhogue *et al.*, (2015).

Au fur et à mesure de la progression du diabète, l'impact de la dérive du métabolisme énergétique devient délétère pour les os, réduisant leur résistance. De plus, comme il a été mentionné plus haut, l'accumulation d'un stress oxydatif ou de produits avancés de glycation au cours du vieillissement accentue le phénomène. Certains désordres vasculaires qui seront développés par la suite conduisent également à long terme à une perturbation du métabolisme osseux et donc à une fragilité osseuse.

Les désordres du métabolisme sont sources de nombreuses pathologies comme l'ostéoporose et le diabète de type 2 ou encore les maladies cardiovasculaires, certaines causes sont donc communes entre ces maladies. De futurs travaux permettront de comprendre en détails les mécanismes physiologiques de l'ostéodystrophie diabétique et ainsi les liens entre le diabète et le système osseux (Epstein *et al.*, 2016).

3.3.2. *Les inflammations de l'intestin et son microbiote*

L'association entre la perte de masse osseuse et l'inflammation est bien connue notamment dans le cas des maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde où la résorption osseuse est médiée par les cytokines inflammatoires produites par les lymphocytes T (Ohlsson & Sjögren, 2015). De plus, chez les femmes développant une ostéoporose suite à la ménopause, la résorption osseuse est favorisée en partie via le système immunitaire. En effet, les œstrogènes agissent au niveau des lymphocytes T comme des immunosuppresseurs, inhibant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme le facteur de nécrose tumorale α (Tumor Necrosis Factor α , TNF- α) et de cytokines favorisant l'ostéoclastogénèse comme RANK-L (D'Amelio & Sassi, 2018).

Les inflammations chroniques constituent une des causes de l'ostéoporose (Dudarić *et al.*, 2015). Les mécanismes d'action sont multiples et encore mal connus mais il semble que l'intestin joue un rôle primordial dans l'initiation d'une réponse immunitaire délétère pour la santé osseuse. Dans ce contexte, plusieurs études ont démontré le rôle du microbiote intestinal dans l'éducation et la modulation du système immunitaire de l'hôte, ainsi que son action sur le métabolisme osseux. Par ailleurs, le microbiote intestinal pourrait être impliqué dans la réponse immunitaire induite par la privation des œstrogènes contribuant à la résorption osseuse (**Figure 12**) (Carvalho & Abdalla Saad, 2013; D'Amelio & Sassi, 2018; Ohlsson & Sjögren, 2015; Villa *et al.*, 2017).

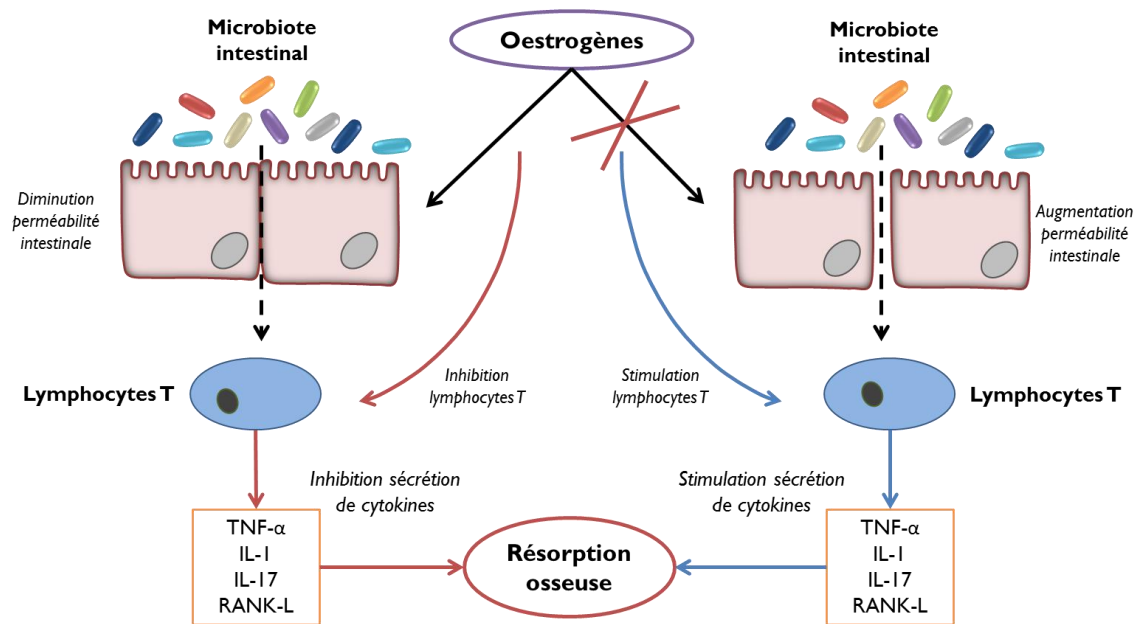


Figure 12 : Représentation schématique de la relation complexe entre le système immunitaire, la perte osseuse associée à la privation des œstrogènes et le microbiote intestinal.

La privation des œstrogènes à la ménopause conduit à une stimulation des lymphocytes T et une augmentation de la perméabilité intestinale. En conséquence, le microbiote intestinal stimule les cellules immunitaires qui produisent différentes cytokines induisant la résorption osseuse.

IL : interleukine, RANK-L : receptor activating nuclear factor B, TNF-α : tumor necrosis factor-α.

D'après D'Amelio *et al.*, (2018).

L'impact du microbiote intestinal sur le développement et la maturation du système immunitaire a été démontré en utilisant des modèles de souris gnotobiotiques (dépourvues de microbiote) ayant un intestin stérile. L'absence de microbiote conduit notamment à une formation défectueuse des organes lymphoïdes, une réduction des plaques de Peyer et un nombre réduit de lymphocytes T (D'Amelio & Sassi, 2018). En outre, une absence de microbiote intestinal conduit à des réponses immunitaires anormales et à une inhibition de l'ostéoclastogénèse (Sjögren *et al.*, 2012). Ces animaux ont en effet un nombre réduit d'ostéoclastes et de faibles taux d'interleukine 6, de RANK-L et de TNF-α, des cytokines bien connues pour leur effet sur la résorption osseuse. Ces travaux montrent la communication existante entre le microbiote intestinal et le système immunitaire de son hôte ainsi que son rôle sur le métabolisme osseux. Certains auteurs ont d'ailleurs reconnu l'existence d'un axe intestin-microbiote-os dont les communications sont principalement médiées via le système immunitaire (Ramsey & Isales, 2017; Villa *et al.*, 2017). Les recherches se focalisant sur cet axe permettront de mesurer l'importance de l'impact du microbiote intestinal, et de l'intestin dans sa globalité, sur le métabolisme osseux.

3.4. L'absorption du calcium

En tant que minéral le plus abondant du corps dont 99 % sont renfermés dans les os et les dents, le calcium est essentiel pour l'intégrité structurale et le fonctionnement métabolique du tissu osseux. Il participe également à la contraction musculaire, à la transmission neuronale et des signaux, à la sécrétion hormonale ou encore au fonctionnement de certaines enzymes (Lanham-New, 2008). Une déficience en calcium ou hypocalcémie est associée au développement de pathologies osseuses comme l'ostéopénie et l'ostéoporose mais également à l'hypertension, la résistance à l'insuline, l'obésité ou le syndrome métabolique (Areco *et al.*, 2015; Soto *et al.*, 2014b). Une hypocalcémie chronique est associée à des symptômes neuropsychiatriques, une formation de la cataracte voire une augmentation de la pression intracrânienne (Hassan-Smith & Gittoes, 2017). Ces symptômes sont majoritairement retrouvés chez les femmes ménopausées, les individus allergiques au lait ou ayant une intolérance au lactose, les adolescents et les personnes âgés (Beto, 2015). Pour ces derniers, il est d'ailleurs recommandé d'avoir un apport en calcium suffisant (> 1000 mg par jour) pour réduire les risques de chutes et de fractures (Carmeliet *et al.*, 2015).

3.4.1. La physiologie du calcium

La concentration en calcium dans l'organisme est régulée en permanence via le récepteur de détection du calcium (Calcium Sensing Receptor, CasR) localisé en particulier au niveau de la glande parathyroïde. Du fait de cette régulation, la concentration en calcium est maintenue par son absorption au niveau intestinal, sa réabsorption par les reins et enfin par le remodelage osseux (Pu *et al.*, 2016).

L'intestin joue un rôle majeur dans l'absorption et le contrôle de la concentration du calcium pour l'organisme. En effet, environ 90 % du calcium est absorbé au niveau de l'intestin grêle (Areco *et al.*, 2015). Le calcium est ainsi fourni par l'alimentation et est disponible sous forme d'ions Ca^{2+} dans la lumière intestinale. L'absorption de ces ions au sein de la muqueuse intestinale a lieu par deux voies distinctes (**Figure 13**).

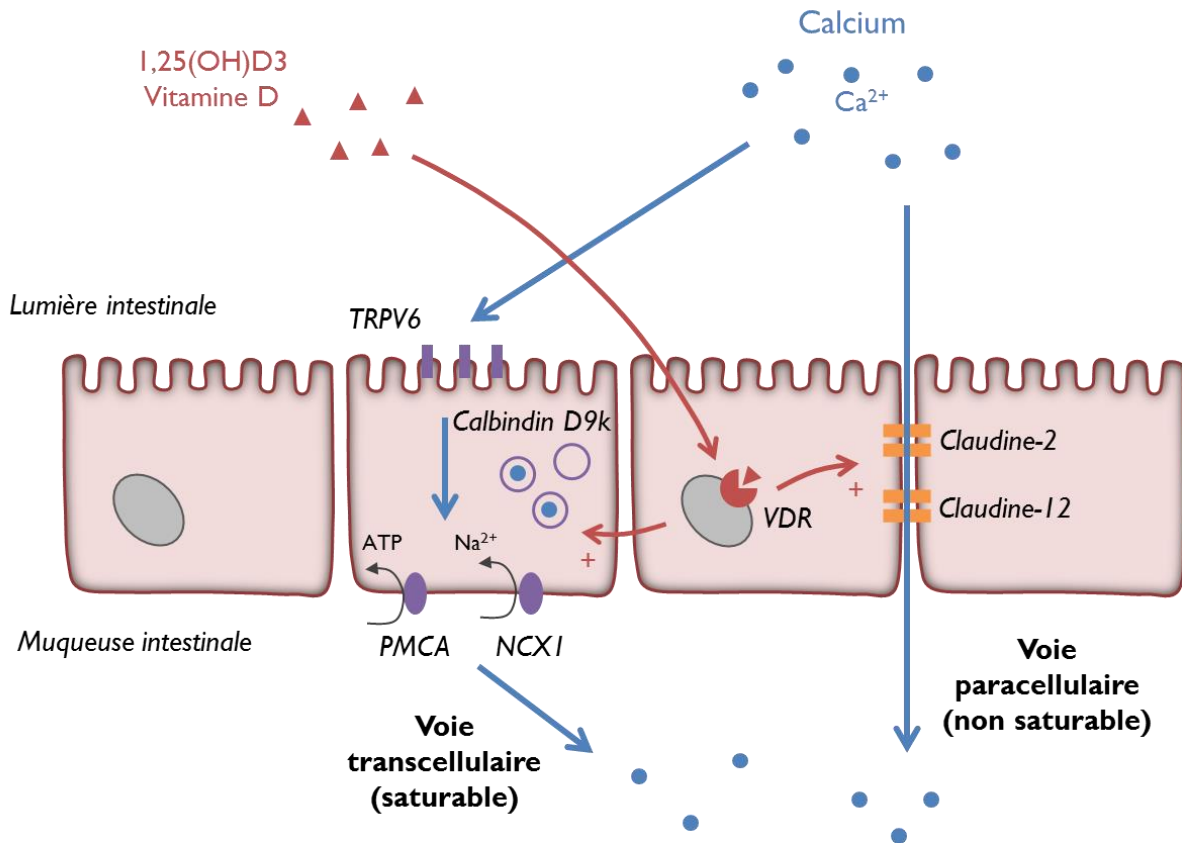


Figure 13 : Représentation schématique de l'absorption intestinale du calcium.

Deux voies d'absorption sont distinguées : la voie paracellulaire et la voie transcellulaire.

PMCA : Plasma Membrane Ca^{2+} ATPase, NCX1 : Sodium-Calcium Exchanger 1.

La voie paracellulaire de l'absorption du calcium consiste en une diffusion passive entre les cellules des ions à travers l'épithélium intestinal, il s'agit d'un phénomène non saturable qui dépend d'un gradient électrique formé entre la lumière et la muqueuse intestinale (Pérez *et al.*, 2008). Cette voie d'absorption est encore peu caractérisée mais de récents travaux ont montré que l'absorption était contrôlée par des protéines des jonctions serrées à savoir la claudine-2 et la claudine-12 qui agissent comme des canaux sélectifs au calcium (Fujita *et al.*, 2008). La voie transcellulaire est quant à elle une voie saturable de l'absorption du calcium qui comprend plusieurs étapes. Premièrement, les ions calcium sont incorporés dans les cellules intestinales via le transporteur du calcium (Transient Receptor Potential Vanilloid 6, TRPV6) également appelé CaT1. Le transport intracellulaire du calcium est ensuite médié par la protéine calbindin D9k, et l'extrusion du calcium est finalement réalisée par deux transporteurs, une ATPase (Plasma Membrane Ca^{2+} ATPase, PMCA) et un échangeur sodium-calcium (Sodium-Calcium Exchanger 1, NCX1) (Fleet & Schoch, 2010; Pu *et al.*, 2016).

Ces deux voies d'absorption sont régulées par la vitamine D (1,25 dihydroxyvitamine D3) (**Figure 13**). Cette hormone agit par interaction avec son récepteur nucléaire (Vitamin D Receptor, VDR). Le couple ainsi formé constitue un facteur de transcription régulant les phénomènes d'absorption intestinale du calcium. A titre d'exemple, le transporteur TRPV6, la calbindin D9k ou les claudines-2 et -12 sont régulés par la vitamine D démontrant son implication dans les deux voies d'absorption du calcium (Bronner, 2003; Fleet, 2017; Fujita *et al.*, 2008; Haussler *et al.*, 2010). En outre, une délétion du VDR chez la souris entraîne une rupture du métabolisme calcique, une hypocalcémie sévère et des concentrations sériques en vitamine D élevées (Van Cromphaut *et al.*, 2001). Bien qu'elle puisse être apportée par l'alimentation, la vitamine D circulante est majoritairement issue de sa synthèse dans la peau à partir d'un dérivé de cholestérol, le 7-dehydroxycholestérol, sous l'effet de la lumière et des radiations UV (**Figure 14**). Cela conduit à la formation de vitamine D3 ou cholécalficérol, cette molécule sera par la suite hydroxylée dans le foie par la 25-hydroxylase pour former la 25-hydroxyvitamine D ou calcidiol. Une seconde hydroxylation aura lieu dans le rein par la 25-hydroxyvitamine D, 1 α hydroxylase pour former la forme active de la vitamine D (1,25 dihydroxyvitamine D3) également appelée calcitriol (Barbáchano *et al.*, 2017; Fleet, 2017).

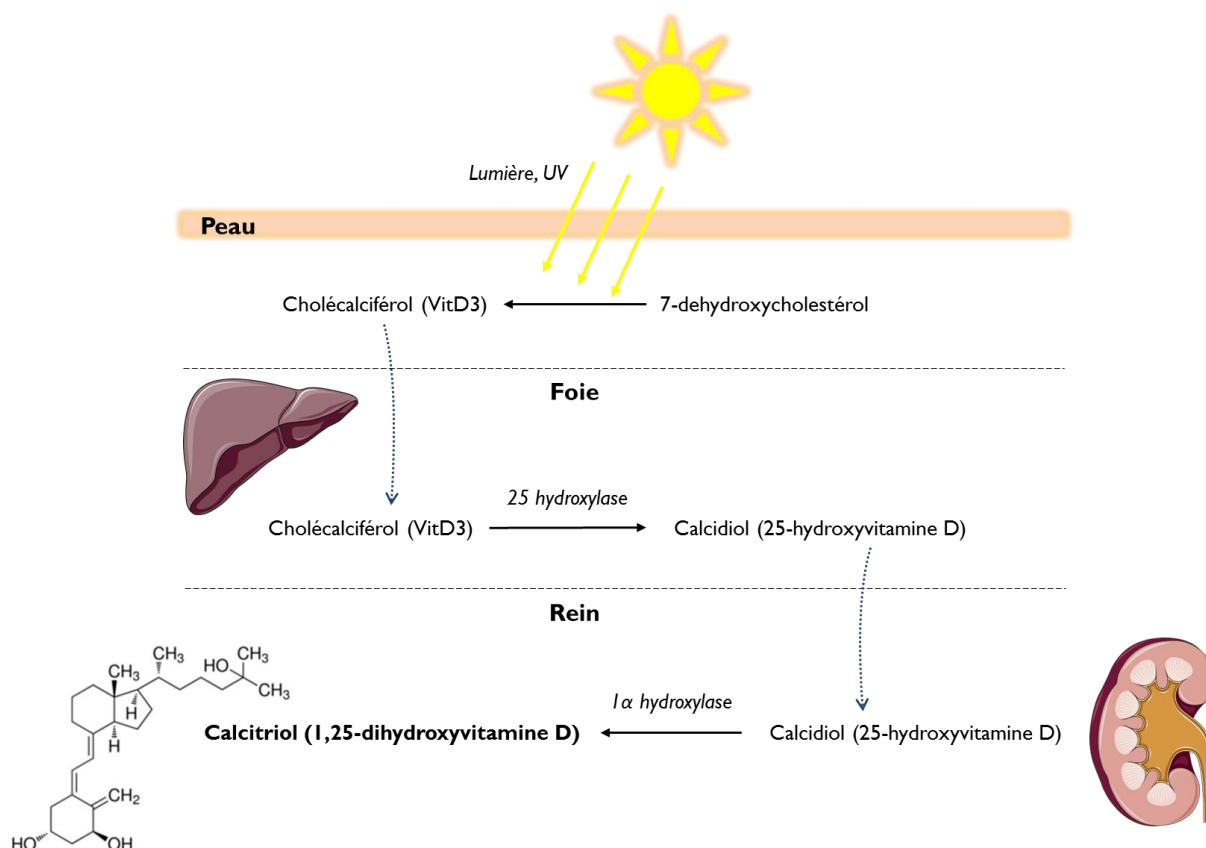


Figure 14 : Biosynthèse de la vitamine D.

La synthèse débute dans la peau à partir d'un dérivé du cholestérol puis se poursuit dans le foie. La dernière étape conduisant à la forme active de la vitamine D a lieu dans les reins.

3.4.2. La régulation de l'homéostasie du calcium et impacts sur le squelette

Comme il a été mentionné plus tôt, la concentration en calcium dans l'organisme est régulée par CasR localisé principalement dans la glande parathyroïde. Ce récepteur fait partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G. En plus du calcium, CasR est capable d'interagir avec de nombreux ligands ainsi que de promouvoir différentes cascades de signalisation (Pu *et al.*, 2016). Premièrement, CasR est capable de réguler la sécrétion de l'hormone parathyroïde ou parathormone (Parathyroïde Hormone, PTH). En plus de la vitamine D, la PTH fait partie des hormones ayant un impact majeur sur l'homéostasie calcique, elle agit en effet directement sur les reins ou les os pour contrôler la concentration du calcium dans l'organisme.

En cas d'hypocalcémie (**Figure 15**), l'activation de CasR conduit à une stimulation de la sécrétion de la PTH par la glande parathyroïde, l'hormone aura un effet direct sur le remodelage osseux en stimulant la résorption osseuse pour mobiliser les réserves de calcium contenues dans les os.

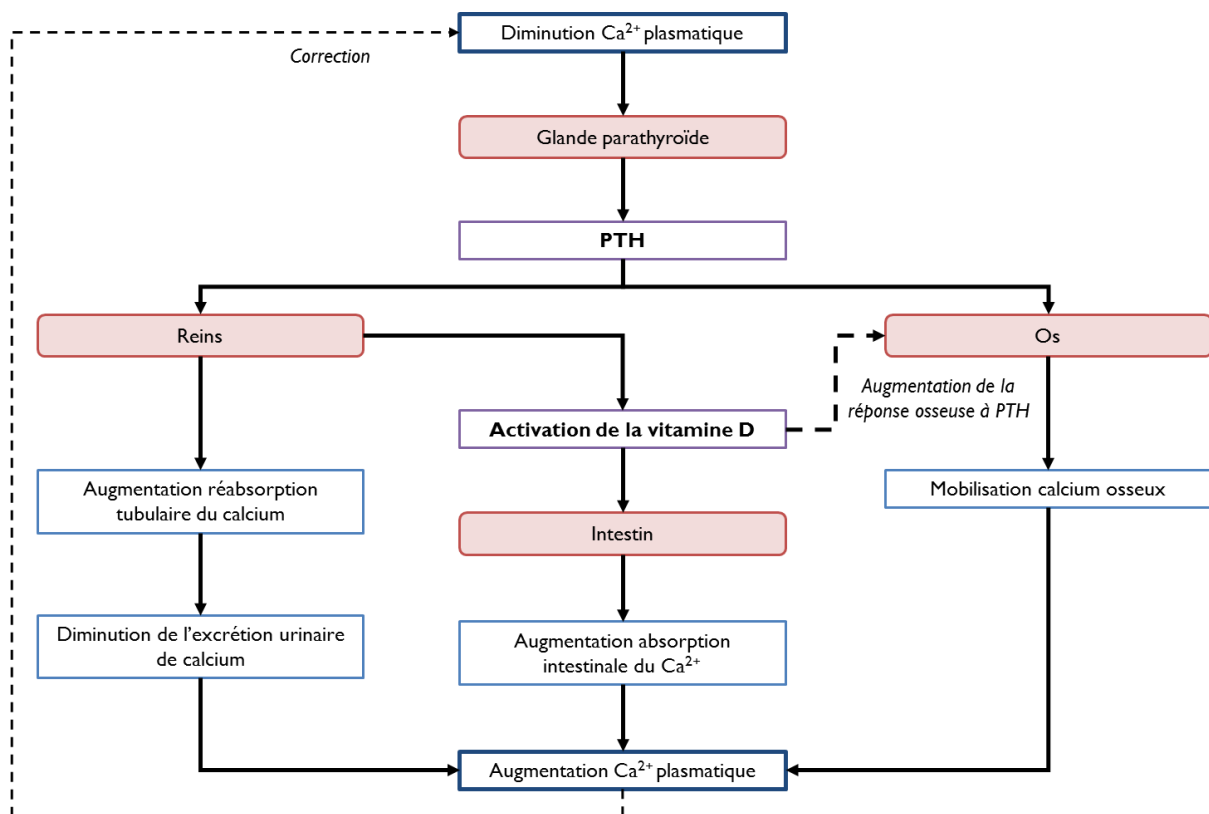


Figure 15 : Interaction de la PTH et de la vitamine D dans la régulation de la concentration du calcium dans le sang.

En cas d'hypocalcémie, la sécrétion de la PTH entraîne une mobilisation du calcium osseux ainsi qu'une augmentation de l'absorption tubulaire et intestinale du calcium. L'ensemble conduit à une augmentation du calcium plasmatique.

PTH : Parathyroid Hormone.

D'après Sherwood (2006).

De plus, la PTH agit sur les reins en augmentant la réabsorption tubulaire des ions Ca^{2+} conduisant à une diminution de la sécrétion urinaire de calcium, enfin la PTH favorise la synthèse et la sécrétion de la forme active de la vitamine D par le rein, ceci afin d'augmenter l'absorption intestinale du calcium (Carmeliet *et al.*, 2015; Fleet & Schoch, 2010; Pu *et al.*, 2016). A l'inverse, une situation d'hypercalcémie entrainera une stimulation par CasR de la sécrétion thyroïdienne de calcitonine, l'hormone a la capacité d'inhiber directement la résorption osseuse en interagissant avec les ostéoclastes pour freiner leur activité (Cashman, 2002; Pu *et al.*, 2016).

D'autres hormones sont également impliquées dans le maintien de l'homéostasie du calcium (Fleet & Schoch, 2010). L'hormone de croissance (Growth Hormone, GH) et son médiateur physiologique l'IGF-1, sont capables indirectement de promouvoir l'absorption intestinale du calcium en augmentant la sensibilité des cellules à la vitamine D. Par ailleurs, les hormones sexuelles (testostérone et œstrogènes) sont impliquées dans le contrôle de l'absorption intestinale du calcium, elles permettent notamment de maintenir le taux de vitamine D et d'agir via les acteurs des voies d'absorption du calcium.

Le maintien d'une homéostasie calcique est essentielle pour le bon fonctionnement du système osseux, cependant des situations d'hypocalcémies favorisent une résorption osseuse et peuvent conduire à terme à des syndromes ostéoporotiques. Chez les personnes âgées, une diminution de l'absorption intestinale du calcium est observée en comparaison à des individus plus jeunes (Nordin *et al.*, 2004). Cette diminution est due, en partie, à un déclin progressif de la concentration en vitamine D dans l'organisme, mais également à une résistance à son action au niveau intestinal. La privation des œstrogènes à la ménopause ou la perte progressive de testostérone peuvent également expliquer ces phénomènes (Pérez *et al.*, 2008). L'ensemble de ces facteurs conduit à des perturbations de l'absorption intestinale du calcium, entrainant un déséquilibre de l'homéostasie calcique, soit une situation favorable à une perte de masse osseuse.

3.5. Le système rénine angiotensine

Initialement, le système rénine angiotensine (SRA) a été découvert et étudié pour son implication dans la régulation physiologique de la pression artérielle systémique et ainsi dans le cadre de l'hypertension. Cependant, de nombreuses études ont démontré son implication dans divers processus physiologiques dont la régulation du métabolisme osseux.

3.5.1. La nouvelle vision du système rénine angiotensine

Le SRA est un système d'hormones circulantes initialement centré sur un peptide appelé l'angiotensine II (AngII). En réponse à une diminution de la pression artérielle, le foie sécrète de l'angiotensinogène dans la circulation sanguine, cette molécule est par la suite clivée dans sa partie N terminale par la rénine produite par les reins, conduisant à la formation d'un décapeptide inactif appelé l'angiotensine I (AngI). Le peptide est ensuite hydrolysé par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (Angiotensin Converting Enzyme, ACE) exprimée en particulier dans les poumons pour donner un octapeptide actif l'AngII. Par fixation au récepteur à l'angiotensine II de type 1 (Angiotensin II Receptor Type 1, AT1R), ce peptide permet d'augmenter la concentration plasmatique d'aldostérone, de promouvoir la vasoconstriction, la rétention d'eau, de sodium et d'augmenter la sensation de soif. L'ensemble de ces activités permet d'augmenter la pression sanguine et de maintenir l'homéostasie vis-à-vis des fluides et des électrolytes, ainsi le SRA fut associé à l'hypertension et aux maladies cardiovasculaires (Wegman-Ostrosky *et al.*, 2015).

Depuis le début des années 2000, une nouvelle vision du système SRA a émergé notamment par la découverte d'une deuxième ACE, l'ACE2 (Zisman, 2005). Ainsi, ce système serait en réalité plus complexe car il conduirait à la génération de différents peptides à partir de l'angiotensinogène. En outre, les peptides générés ne le sont pas uniquement dans la circulation systémique, mais ils pourraient être produits localement dans plusieurs tissus et organes du corps. Ainsi, l'AngII n'est pas l'unique peptide actif du SRA, de nouveaux peptides ayant des propriétés fonctionnelles similaires ou différentes, ont été identifiés issus de l'hydrolyse de l'AngII : un heptapeptide l'angiotensine III (2-8) (AngIII), un hexapeptide l'angiotensine IV (3-8) (AngIV) et enfin un second heptapeptide (1-7) (**Figure 16**).

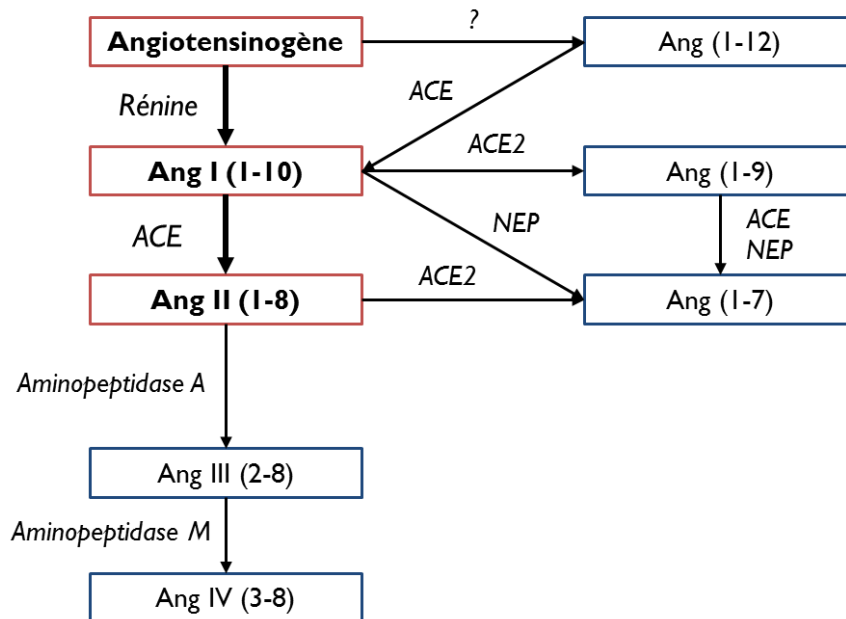


Figure 16 : La nouvelle vision du système rénine angiotensine.

Le système classique est représenté en rouge. Les valeurs entre parenthèses indiquent la taille des peptides. Ang : Angiotensine, ACE : Enzyme de Conversion de l'Angiotensine, NEP : Neprilysine. D'après Fändriks, (2011).

Les effets de ces peptides sont principalement médiés par deux récepteurs, l'AT1R et le récepteur de l'angiotensine II de type 2 (AT2R) mais également par les récepteurs Mas (Mas-Related G protein-Coupled Receptors) (Wegman-Ostrosky *et al.*, 2015). L'ACE2 est exprimée dans le cœur, les reins et dans le tractus gastro-intestinal. Elle contrebalance l'action de l'ACE en hydrolysant l'AngI et l'AngII pour produire d'autres peptides. Une augmentation de l'expression de l'ACE2 chez des rats hypertensifs a conduit à une diminution significative de la pression sanguine (Wu *et al.*, 2017).

Ainsi, le SRA peut avoir des impacts à différents niveaux du corps et notamment au sein de la muqueuse intestinale. Par définition, l'AngII est un constricteur des muscles lisses des vaisseaux sanguins et par conséquent de la musculature de la paroi intestinale entraînant ce qui pourrait être qualifié d'hypertension intestinale. En réalité, tous les acteurs du SRA sont présents et fonctionnels dans l'intestin notamment au niveau des cellules épithéliales intestinales (Fändriks, 2011), la présence de l'ACE d'ailleurs a été retrouvée chez les cellules Caco-2 (Howell *et al.*, 1993). Des études ont montré que le SRA localisé au niveau de la muqueuse intestinale est probablement impliqué dans l'absorption du glucose et qu'une perturbation du système contribue à l'hyperglycémie postprandiale observée chez des sujets atteints de diabète de type 1 ou 2 (Fändriks, 2011; Wong *et al.*, 2012). Ces observations

suggèrent que les traitements dédiés à l'inhibition de l'ACE n'ont pas forcément besoin d'être absorbés par l'organisme puisqu'ils peuvent agir via les récepteurs présents dans l'intestin et débiter une cascade de signalisation. De plus, la modulation du SRA par différents composés peut également être médiée via une action sur l'ACE2 permettant de contrebalancer l'effet de l'ACE (Wu *et al.*, 2017).

3.5.2. Les liens entre le système rénine angiotensine et le système osseux

La mise en évidence d'une relation entre le SRA et le tissu osseux a été observée après analyse des données épidémiologiques concernant l'ostéoporose et les maladies cardiovasculaires. En effet, une faible BMD est associée à une augmentation de la mortalité prématurée par maladies cardiovasculaires. Traditionnellement, un lien entre ces pathologies n'est pas considéré, mais de récentes études montrent une relation dans la progression de ces maladies qui ne peut pas être uniquement liée à l'âge. Plusieurs mécanismes et facteurs communs ont été proposés afin de relier ces pathologies comme l'inflammation, le stress oxydatif, l'implication des hormones sexuelles ou encore une déficience en vitamine D (Farhat & Cauley, 2008).

Par ailleurs, des traitements contre l'hypertension en particulier ceux utilisant les inhibiteurs de l'ACE ont présenté des impacts positifs au niveau des os et ont amélioré le métabolisme osseux. Chez des hommes âgés, une prise continue d'inhibiteurs d'ACE permet à long terme de diminuer la perte osseuse (Rianon *et al.*, 2017). Une étude réalisée sur des rats atteints d'arthrose a montré que l'utilisation d'aliskirène, un inhibiteur de la rénine, a permis d'atténuer la destruction du cartilage ainsi que de protéger les cellules osseuses via le SRA local (Yan & Shen, 2017). Concernant le captopril, un inhibiteur bien connu de l'ACE, son utilisation lors d'études animales a montré différents effets sur le métabolisme osseux en fonction du modèle utilisé. Chez des souris atteintes de diabète de type 1, le captopril n'a pas montré d'effets bénéfiques sur le squelette, même si une atténuation locale du SRA a été mise en évidence au niveau des os (Diao *et al.*, 2014). Chez des rates ayant subi une ovariectomie et développant ainsi une ostéoporose, l'utilisation de captopril a permis d'améliorer la BMD des os trabéculaires (Chen *et al.*, 2018c) ainsi que d'autres marqueurs du développement osseux. Sur le même modèle, il a été montré que l'inhibition de l'ACE conduit à une activation de l'axe ACE2/Ang1-7/récepteurs Mas entraînant une inhibition de l'ostéoclastogénèse (Abuhashish *et al.*, 2017). Ces travaux montrent la relation existante entre le SRA et le métabolisme osseux qui conduira à l'émergence de nouvelles stratégies préventives ou thérapeutiques pour lutter contre les pathologies osseuses et cardiovasculaires (Farhat & Cauley, 2008).

III. De nouvelles stratégies de prévention dont l'utilisation des Lactobacilles

En tant que maladie métabolique, l'ostéoporose présente de multiples causes, limitant le développement d'approches préventives efficaces. Cependant, certains traitements ont pu être développés en ciblant plusieurs voies et molécules impliquées dans le métabolisme osseux. Récemment, des approches préventives ont émergées en se fondant sur des modifications des comportements alimentaires et la recherche de composés naturels bioactifs sur la santé osseuse. Dans ce contexte, les Lactobacilles constituent de potentiels d'ingrédients santé.

1. L'impact des traitements et stratégies de prévention actuelles

Depuis les 30 dernières années, les recherches et les développements de traitements et méthodes préventives contre l'ostéoporose ont considérablement évolués. En 1980, les médecins ne pouvaient proposer que des supplémentations en œstrogènes ou en calcium et vitamine D pour diminuer les risques de fractures osseuses chez les femmes en période de post-ménopause (Khosla & Hofbauer, 2017). A présent, de nouvelles voies thérapeutiques ont émergées, se basant sur différents mécanismes d'action (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Traitements actuels de l'ostéoporose, leurs mécanismes et inconvénients.
D'après Reid, (2015) et Khosla & Hofbauer, (2017).

Traitement	Mécanisme	Inconvénient(s)
Supplémentation en calcium et vitamine D	Maintien de l'homéostasie calcique	Efficacité limitée
Œstrogènes / SERM	Inhibition de l'ostéoclastogénèse	Risque accru de maladies cardiovasculaires et certains cancers
Biphosphonates	Analogues du pyrophosphate (anti-résorptifs)	Fracture de stress, ostéonécrose de la mâchoire, hypercalcémie
Strontium	Calcimimétique (anti-résorptifs)	Réactions dermatologiques, augmentation du risque d'infarctus
PTH et analogues	Anti-résorptifs, induit la formation osseuse	Risques accrus d'ostéosarcomes
Denosumab	Anticorps monoclonal dirigé contre RANK-L	Effet à long terme inconnu
Odanacatib	Inhibiteur de la cathepsine K	Besoins d'inhibiteurs spécifiques

Une supplémentation en calcium et en vitamine D fut une approche envisagée afin de maintenir l'homéostasie calcique chez les personnes âgées. Cependant, cette supplémentation n'est pas suffisante en elle-même, le calcium apporté n'étant que faiblement absorbé au niveau intestinal, ce qui n'entraîne pas d'impact significatif sur le métabolisme osseux. Une supplémentation en vitamine D est néanmoins nécessaire afin de soigner l'ostéomalacie (perte de minéralisation des os) (Brincat *et al.*, 2015; Jackson *et al.*, 2006; Reid, 2015).

Par ailleurs, les études cliniques montrent qu'un apport d'œstrogènes en début de ménopause peut maintenir la BMD et réduire le risque de fracture. L'efficacité d'une telle approche est néanmoins limitée et présente certains effets secondaires tels que des risques accrus de maladies cardiovasculaires. En effet, les récepteurs aux œstrogènes sont exprimés dans différents organes du corps et leurs effets physiologiques sont nombreux (Reid, 2015; Rossouw *et al.*, 2007). Récemment, la synthèse de dérivés des œstrogènes a permis de développer des modulateurs des récepteurs aux œstrogènes sélectifs (Selective Estrogen-Receptor Modulator, SERM), l'exemple le plus connu étant le raloxifène. Cette molécule est capable d'avoir un effet similaire aux œstrogènes sur le tissu osseux tout en ayant un impact moindre sur les autres organes, certains effets indésirables ont néanmoins été observés (Khosla & Hofbauer, 2017).

Les biphosphonates comptent parmi les agents thérapeutiques les plus utilisés dans le traitement de l'ostéoporose. Ces analogues du pyrophosphate sont capables de se fixer aux cristaux d'hydroxyapatite formant les os et ainsi intégrer le tissu osseux. Par la suite, les biphosphonates sont ingérés par les ostéoclastes lors de la résorption osseuse et inhibent l'activité cellulaire, ils constituent ainsi des anti-résorptifs. La durée du traitement varie de 3 à 5 mois, les biphosphonates ont montré une bonne efficacité à court terme mais certaines craintes existent quant à leur innocuité à long terme (McClung *et al.*, 2001; Reid, 2015; Russell *et al.*, 2008).

Beaucoup moins utilisé, le strontium est un cation divalent proche du calcium, il agit ainsi comme un calcimimétique. Cet élément présente des propriétés similaires à celles du calcium, il remplace ainsi les ions Ca^{2+} au sein du tissu osseux et son absorption intestinale est équivalente, il est d'ailleurs reconnu par CasR. Le strontium est administré sous forme de poudre par prise orale journalière, sa consommation entraîne une augmentation de la BMD et une diminution du risque de fractures mais son mécanisme d'action reste incertain (Meunier *et al.*, 2004). En outre, le strontium présente plusieurs effets indésirables tels que des réactions dermatologiques sévères et sa consommation répétée conduit à une augmentation du risque d'infarctus du myocarde d'environ 60 % (Reid, 2015).

Tandis qu'une augmentation de la sécrétion de la PTH conduit à une activation de la résorption osseuse, son administration en continue (une injection sous-cutanée de 20 à 40 µg par jour) entraîne des effets variés sur le remodelage osseux notamment une stimulation de la résorption mais également de la formation osseuse. *In fine*, l'effet d'un tel traitement pendant 18 mois conduit à une augmentation globale de la masse osseuse (Neer *et al.*, 2001). Ainsi, des analogues de la PTH ont été développés comme traitements anti-résorptifs notamment le tériparatide (fragment 1-34 de la PTH) (Feng *et al.*, 2015; Lindsay *et al.*, 2004). Certains résultats montrent néanmoins un risque accru de développement d'un ostéosarcome suite à ces traitements (Reid, 2015).

Au cours de l'année 2000, la découverte de RANK-L comme facteur stimulateur de l'ostéoclastogénèse, a conduit au développement du denosumab, un anticorps monoclonal dirigé contre RANK-L (Khosla & Hofbauer, 2017). Il est administré par injection sous-cutanée tous les 6 mois, de plus, le denosumab présente une efficacité remarquable vis-à-vis de la réduction des risques de fractures, et les effets indésirables sont rares mais son impact à long terme (> 5 ans) reste à étudier (Cummings *et al.*, 2009).

Autre cible thérapeutique, la cathepsine K est une protéase sécrétée par les ostéoclastes pour dégrader la matrice osseuse en particulier les fibres de collagène. Théoriquement, l'inhibition sélective de la cathepsine K des ostéoclastes réduit leur activité tout en conservant l'action des ostéoblastes intacte. Utilisé dans ce but, l'odanacatib est un inhibiteur de la cathepsine K, son impact sur le métabolisme osseux a été évalué cliniquement et a montré des effets bénéfiques sur la BMD. La cathepsine K est cependant retrouvée un peu partout dans le corps humain, son inhibition généralisée conduit ainsi à des effets secondaires indésirables tels que des réactions dermatologiques et des inflammations du poumon. Des inhibiteurs spécifiques de l'enzyme présente au sein du tissu osseux doivent ainsi être développés (Anderson *et al.*, 2014).

D'une façon générale, de nombreuses avancées thérapeutiques contre l'ostéoporose ont été réalisées ces dernières années. Les thérapies actuelles réduisent en effet significativement les risques de fractures des vertèbres et de la hanche (Reid, 2015). Cependant, certains doutes persistent quant aux effets de ces traitements sur le long terme, et de futures études seront requises pour démontrer la pérennité de leur efficacité. De plus, certains effets indésirables ont été reportés au cours des différentes études cliniques, ceci en particulier pour les biphosphonates où de rares cas de fractures de stress fémorales ainsi que d'ostéonécrose de la mâchoire sont observés (Khosla & Hofbauer, 2017). Devant ces effets indésirables, des approches de

prévention sont recommandées, notamment par l'adoption d'une alimentation quotidienne fournissant des quantités adéquates de calcium et de vitamine D (Cosman *et al.*, 2014).

2. Une alimentation santé appliquée à la prévention de l'ostéoporose

La nutrition est un facteur environnemental qui influence énormément la perte osseuse et le risque de fractures (Biver, 2018). Pour le maintien d'une bonne santé osseuse, les autorités recommandent une alimentation offrant des apports adéquats de calcium et de vitamine D. Contrairement aux stratégies de supplémentation où une faible absorption du calcium est observée, l'apport de calcium par l'alimentation est un moyen d'augmenter sa biodisponibilité et donc son absorption via des interactions avec différentes matrices alimentaires comme le lait (Scholz-Ahrens *et al.*, 2016; Skibsted, 2016). De plus, l'ostéoporose étant une maladie métabolique aux multiples causes (Cosman *et al.*, 2014), la nutrition peut bénéficier au système osseux par de nombreuses voies et ainsi améliorer l'état général du squelette (Weaver, 2015).

2.1. Une nutrition pour médecine

Au cours de la vie, le régime alimentaire a un impact considérable sur la promotion et le maintien d'un bon état de santé. Son rôle déterminant dans le développement des maladies non transmissibles est bien documenté, il occupe ainsi une place de choix dans les activités de prévention de ces pathologies. Les maladies non transmissibles comprennent le diabète, les maladies cardiovasculaires, le cancer, l'ostéoporose et les maladies dentaires. Leur occurrence ne cesse d'augmenter, en 2001 approximativement 60 % des 56,5 millions de décès dans le monde ont été attribués à ces maladies. La même année, les maladies non transmissibles représentaient 46 % des pathologies recensées et cette proportion risque d'atteindre 57 % d'ici 2020 (FAO/WHO, 2003). Aujourd'hui, elles sont responsables de près de 70 % des décès mondiaux (Braconi *et al.*, 2017).

Défini pour la première fois en 1975, le syndrome métabolique a été décrit comme un cluster de symptômes favorisant le risque de développer une maladie non transmissible (**Figure 17**) (O'Neill & O'Driscoll, 2015).

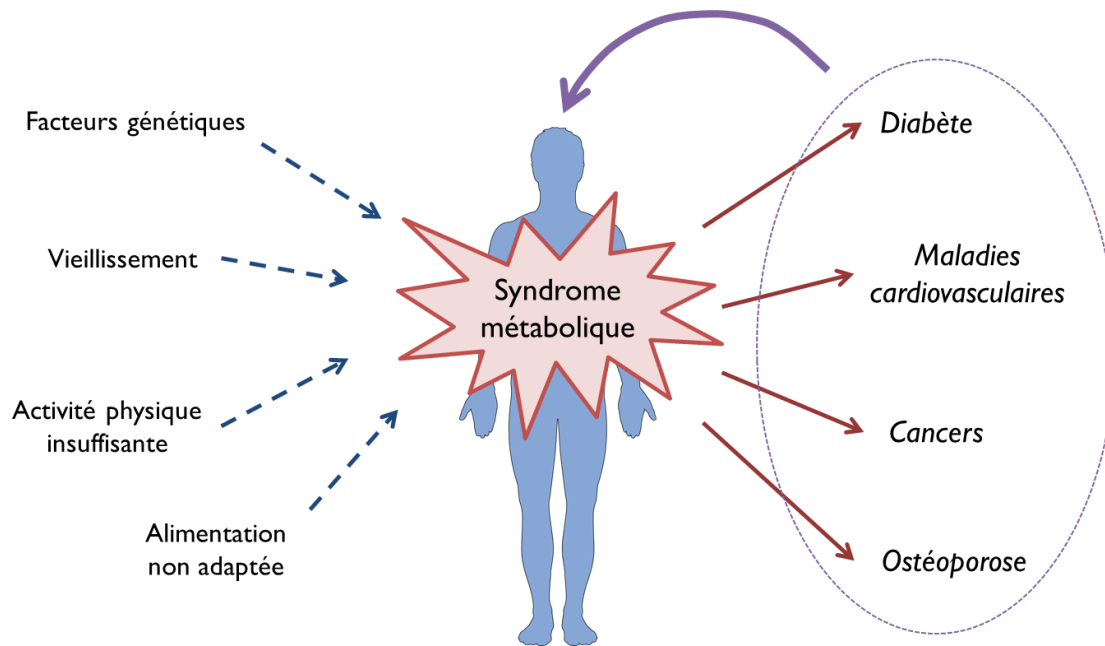


Figure 17 : Causes et conséquences du syndrome métabolique.

Différents facteurs génétiques et environnementaux (à gauche) favorisent l'apparition d'un syndrome métabolique qui en retour conduit au développement de certaines pathologies (à droite). Ces mêmes pathologies accentuent le syndrome métabolique.

La pathophysiologie est complexe et inclut notamment une résistance à l'insuline ou encore l'hypertension. Les facteurs déterminants du syndrome métabolique sont la génétique, le vieillissement, une faible activité physique et une alimentation riche en matière grasse et en carbohydrates (Bonomini *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2018a; Kassi *et al.*, 2011; O'Neill & O'Driscoll, 2015). Ainsi il est établi que des modifications du mode de vie et/ou du régime alimentaire constituent les approches les plus prometteuses pour réduire la prévalence du syndrome métabolique, et par extension des maladies non transmissibles (Braconi *et al.*, 2017).

Au cours de la dernière décennie, les recherches sur la nutrition ont subies une réorientation progressive. Traditionnellement tournées vers la mise en évidence de nouvelles sources alimentaires pour nourrir la population, de plus en plus de projets de recherche se concentrent maintenant sur l'impact de l'alimentation sur l'organisme, et surtout comprendre comment la nutrition peut améliorer ou restaurer un bon état de santé (Cornier *et al.*, 2008). Dans ce contexte, un nouveau domaine scientifique a émergé en 2009, la Foodomique. Elle est définie comme « une discipline étudiant les domaines de la nutrition et de l'aliment par applications des technologies Omiques afin d'améliorer la santé, le bien-être et la confiance des consommateurs » (Braconi *et al.*, 2017; Cifuentes, 2009). Cette nouvelle discipline soulève de nombreux défis en particulier la compréhension des impacts positifs ou négatifs des aliments sur la santé mais également l'évaluation de la qualité et de la sûreté des produits alimentaires,

des critères de plus en plus demandés par les consommateurs (Bimbo *et al.*, 2017). Ces recherches conduisent par ailleurs à la caractérisation des matrices alimentaires, à l'identification de molécules potentiellement bioactives sur la santé ainsi qu'à une compréhension de leurs mécanismes d'action et la démonstration de leur efficacité. L'application de ces travaux permet le développement de nutraceutiques ou aliments fonctionnels contribuant à différents bénéfices santé (Braconi *et al.*, 2017; Martirosyan & Singh, 2015; Ravindran & Jaiswal, 2016).

2.3. Des ingrédients actifs améliorant la santé osseuse

De nombreuses études ont démontré l'efficacité de l'utilisation de substances naturelles ou de nutraceutiques variés comme agents thérapeutiques dans le traitement de certaines maladies osseuses. Ces composés peuvent être classés en 4 catégories à savoir, les molécules phytochimiques, les peptides bioactifs et les protéines, les prébiotiques et enfin les probiotiques.

Par définition, les molécules phytochimiques sont des substances naturelles issues du métabolisme secondaire des végétaux. Un grand nombre de ces molécules ont été testées *in vitro* et/ou *in vivo* pour leurs capacités à prévenir une diminution de la masse osseuse (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Exemples d'agents naturels exerçant un impact positif sur le métabolisme osseux. D'après Pandey *et al.*, (2018).

Molécule	Source	Molécule	Source
Resvératrol	<i>Vitis vinifera</i> (vigne rouge)	Syringétine	<i>Lysimachia congestiflora</i> (lysimaque)
Curcumine	<i>Curcuma longa</i> (curcuma)	Acide oléanolique	<i>Phytolacca americana</i> (raisin d'Amérique)
Quercétine	<i>Allium cepa</i> (oignon)	Obovatol	<i>Magnolia obovate</i>
Withanolide	<i>Acnistus arborescens</i>	Acide gambogique	<i>Garcinia hamburyi</i> (gamboge)
Silibinine	<i>Sylibum marianum</i> (chardon marie)	Harpagoside	<i>Harpagophytum procumbens</i> (griffe du diable)
Acide rosmarinique	<i>Rosmarinus officinalis</i> (romarin)	Wedelolactone	<i>Eclipta alba</i> (bhringaraj)
Lupéol	<i>Senegalia visco</i> , <i>Abronia villosa</i> , <i>Mangifera</i>		

Les effets sont souvent médiés via l'inhibition de l'ostéoclastogénèse ou la stimulation de la différenciation des ostéoblastes (Pandey *et al.*, 2018). Une forte majorité de ces molécules fait partie de la classe des polyphénols, capables notamment d'exercer des effets antioxydants, anti-inflammatoires ou un effet similaire aux œstrogènes (Dudarić *et al.*, 2015). A titre d'exemple, la curcumine isolée de rhizomes du curcuma, la quercétine mise en évidence chez l'ail et la génistéine isolée de graines de soja, sont des molécules phytochimiques ayant démontré un impact positif sur le métabolisme osseux (Pandey *et al.*, 2018). La molécule la plus étudiée pour son action sur le tissu osseux est probablement le resvératrol, un polyphénol de la famille des stilbènes retrouvé notamment dans le raisin, la mûre ou la cacahuète. Les études ont montré qu'une supplémentation en resvératrol prévient la perte de masse osseuse suite à la privation des œstrogènes, ces effets sont principalement médiés par une action anti-inflammatoires (Tou, 2014).

Les prébiotiques sont généralement des carbohydrates retrouvés naturellement chez les végétaux ou issu d'une production synthétique via la conversion enzymatique des sucres. Ils sont considérés comme des fibres alimentaires non digestibles qui sont sélectivement métabolisées par le microbiote intestinal. Cette action bénéficie au développement de microorganismes particuliers au sein du microbiote exerçant en retour un impact bénéfique sur l'organisme. Les prébiotiques les plus utilisés sont les fructanes dont l'inuline ou les fructo-oligosaccharides (FOS), les galacto-oligosaccharides (GOS), les dérivés du lactose et les fibres solubles du blé (Petschow *et al.*, 2013; Whisner & Castillo, 2018). *In vivo*, ces fibres sont capables d'accroître l'absorption intestinale du calcium résultant en une amélioration de la BMD et de la résistance du squelette (Scholz-Ahrens *et al.*, 2016, 2007). Ces effets semblent principalement médiés via une interaction entre les prébiotiques et le microbiote intestinal (Mohajeri *et al.*, 2018).

Les protéines alimentaires sont de plus en plus étudiées pour leur impact positif sur la santé, ces effets sont principalement médiés de par la présence de séquences peptidiques spécifiques encryptées dans leur séquence primaire et appelées peptides bioactifs. De telles séquences peuvent être libérées suite à l'hydrolyse enzymatique des protéines et ainsi exercer une activité bénéfique sur la santé. A titre d'exemple, les phosphopeptides de caséines (Casein phosphopeptides, CPP) sont capables d'impacter le tissu osseux notamment en améliorant l'absorption intestinale du calcium (Donida *et al.*, 2009). L'étude des peptides bioactifs constitue une partie de ce projet de thèse et une partie bibliographique leur sera consacrée dans le chapitre 4.

Enfin, les probiotiques sont des microorganismes capables d'exercer une action positive sur la santé de leur hôte. Certains organismes peuvent ainsi impacter le métabolisme osseux via une action au niveau de l'intestin. Dans ce domaine, les probiotiques les plus couramment utilisés font partie des genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* (Parvaneh *et al.*, 2014). A l'instar des peptides bioactifs, les probiotiques constituent une autre partie du projet de thèse et une partie bibliographique leur est consacrée dans le chapitre 3. Les souches de Lactobacilles représentent la base des travaux réalisés au cours de ce projet, en effet le genre *Lactobacillus* (*L.*) constitue une source conséquente d'ingrédients santé.

3. Les Lactobacilles, sources d'ingrédients santé

Les bactéries lactiques constituent un groupe ayant des similarités en termes de morphologie, métabolisme et physiologie. Elles sont également proches phylogénétiquement. Les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus* constituent les genres principaux mais de récentes révisions ont proposé l'addition de nouveaux genres à savoir, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella* (Khalid, 2011). Le genre *Lactobacillus* constitue le genre le plus représenté parmi les bactéries lactiques, ces organismes sont d'ailleurs reconnus pour leur importante diversité génétique et métabolique (Claesson *et al.*, 2007).

3.1. Des généralités sur les Lactobacilles

Appartenant au phylum des *Firmicutes*, les Lactobacilles sont caractérisés par un Gram-positif, une absence de catalase, un faible taux de GC (Guanine/Cytosine) et la production d'acide lactique comme principal produit de fermentation. Ils sont non mobiles, non sporulants et généralement aérotolérants ou anaérobies (Felis & Dellaglio, 2007; Khalid, 2011). Le genre *Lactobacillus* constitue le plus large groupe au sein des bactéries lactiques avec plus de 200 espèces et sous espèces (Sun *et al.*, 2015). Ces souches sont particulièrement importantes dans la microbiologie alimentaire et la nutrition humaine, leur utilité générale est liée à leur capacité à fermenter une large variété de substrats carbonés et ainsi à produire des acides et autres métabolites contribuant au goût, à la texture, à la conservation ou à la valeur nutritionnelle des aliments (Angelis *et al.*, 2016).

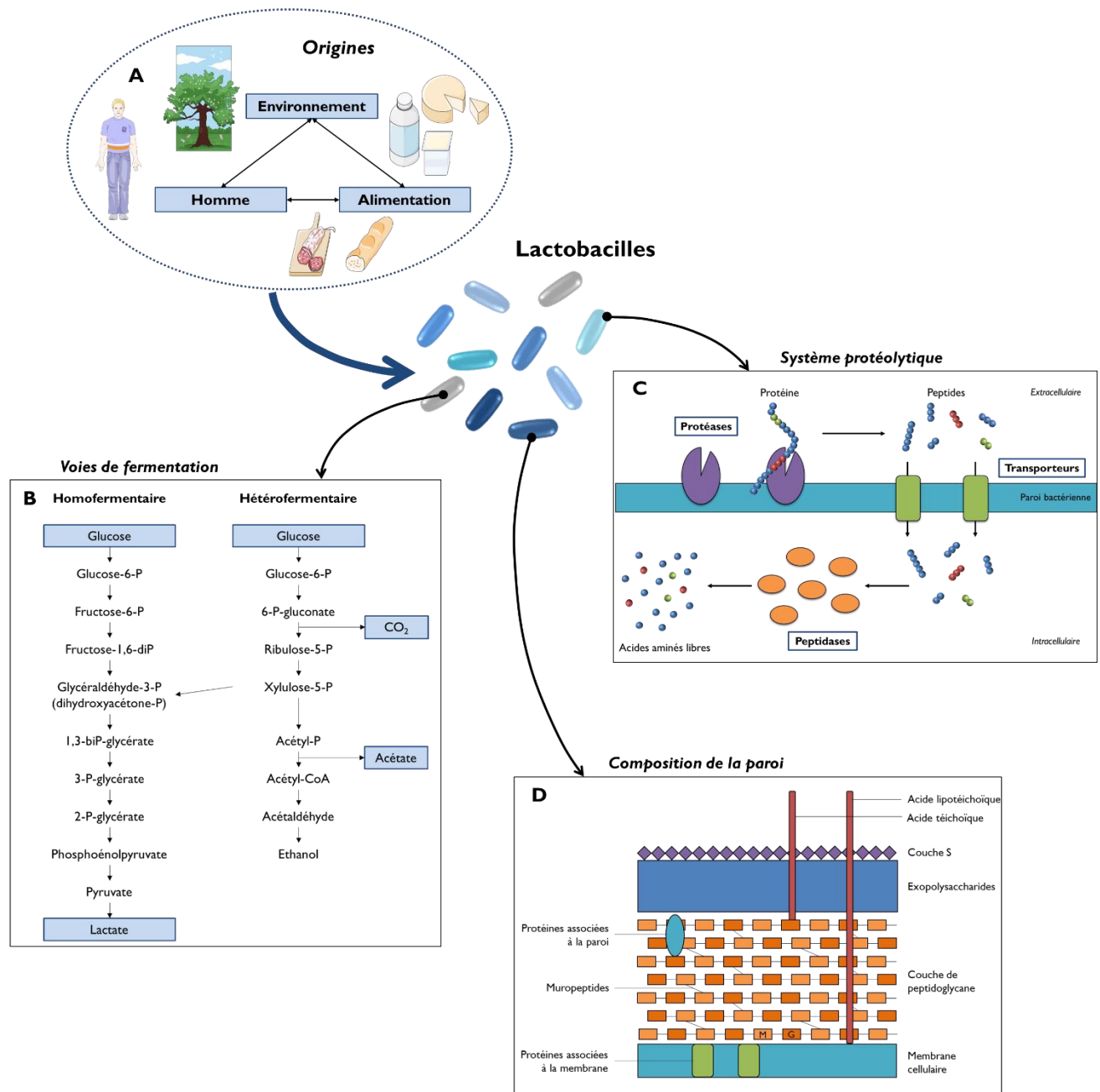


Figure 18 : Des généralités sur les Lactobacilles.

A : Origines des Lactobacilles

B : Principales voies fermentaires des Lactobacilles.

C : Système protéolytique des Lactobacilles.

D : Composition de la paroi des Lactobacilles.

P : Phosphate.

Historiquement, les Lactobacilles sont utilisés par l'homme depuis l'Antiquité. Ils sont ainsi retrouvés dans bon nombre d'aliments tels que le fromage, le yaourt, le pain au levain, les olives de table, le saucisson, la choucroute, la bière, le vin et les produits fermentés à base de poisson (De Angelis & Gobbetti, 2004; Salvetti & O'Toole, 2017). Ils ont néanmoins d'autres habitats naturels comme les plantes, le sol, les silos ou les eaux usées (Claesson *et al.*, 2007). De plus, certaines espèces sont retrouvées naturellement chez l'homme au niveau de la bouche, dans le lait maternel (Soto *et al.*, 2014a), au sein du microbiote intestinal, en particulier dans l'intestin grêle à hauteur de 1 à 5 % (Donaldson *et al.*, 2015) et 99 % de la flore vaginale est constituée de Lactobacilles (Lebeer *et al.*, 2018) (**Figure 18A**).

Les Lactobacilles ont principalement un métabolisme de type fermentaire même si certaines études ont montré de potentielles voies de respiration (Salvetti & O'Toole, 2017). Deux voies de fermentation sont distinguées selon les souches, un type homofermentaire où le pyruvate est majoritairement converti en acide lactique, et un type hétérofermentaire où d'autres métabolites sont produits en plus de l'acide lactique, en sachant que ce mode de fermentation peut être obligatoire ou facultatif selon les souches (**Figure 18B**) (Claesson *et al.*, 2007). Concernant le métabolisme des carbohydrates, une variabilité importante est observée en fonction des espèces et des souches. Les Lactobacilles peuvent fermenter le citrate ainsi que de nombreux sucres tels que le glucose, le lactose, le galactose, le mannose, le saccharose voire même certains prébiotiques. Tous ces sucres sont finalement convertis en glucose qui subira ensuite la glycolyse pour former du pyruvate. Ce pyruvate est ensuite métabolisé de différentes manières selon les souches, il conduit majoritairement à la production d'acide lactique mais différents acides ou métabolites peuvent être produits. Les Lactobacilles peuvent en effet modifier leur métabolisme en fonction des conditions de culture ou de stress environnemental (Angelis *et al.*, 2016). Ces variations de métabolisme chez les Lactobacilles conduisent à une production de divers métabolites en fonction des espèces, ce qui contribue aux propriétés organoleptiques des aliments fermentés.

Concernant leur nutrition azotée, les Lactobacilles ont la particularité d'être auxotrophes pour de nombreux acides aminés. Ils possèdent ainsi un système protéolytique particulier capable d'hydrolyser les protéines présentes dans leur environnement afin de subvenir à leurs besoins. Ce système initie la protéolyse dans le milieu extérieur pour former des peptides qui seront internalisés dans la cellule puis hydrolysés en acides aminés (Savijoki *et al.*, 2006) (**Figure 18C**).

La paroi des Lactobacilles présente certaines variations dans son architecture en fonction des espèces ou souches. Ces organismes sont d'ailleurs capables de modifier sa composition en fonction des changements environnementaux. Cette paroi bactérienne est composée d'une couche épaisse de peptidoglycanes contenant des acides téichoïque et lipotéichoïque, des exopolysaccharides, des pilis et des protéines ancrées à la paroi via différents mécanismes (**Figure 18D**). Selon les espèces, une couche additionnelle de protéines cristallines entoure le peptidoglycane, appelée couche S (S Layer) (Sengupta *et al.*, 2013).

3.2. Un genre bactérien diversifié

Le genre *Lactobacillus* est défini comme polyphylétique, c'est-à-dire qu'il englobe les descendants de plusieurs ancêtres communs parmi les plus récents (Most Recent Common Ancestors, MRCAs), en particulier ceux des genres *Pediococcus*, *Weissella*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Fructobacillus*. Cette caractéristique est une première démonstration de la diversité du genre *Lactobacillus* en tant que genre issu de plusieurs ancêtres ayant des métabolismes variés.

En outre, les études de génomiques comparatives (Stefanovic *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2015) ont montré l'impressionnante diversité des Lactobacilles. Le premier génome séquencé fut celui du *L. plantarum* WCFS1 en 2003, suivi du *L. johnsonii* NC533 et du *L. acidophilus* NCFM les années suivantes. En 2016, 214 génomes du genre *Lactobacillus* sont disponibles, leur taille variant de 1,23 Mpb (*L. sanfranciscensis*) à 4,91 Mpb (*L. parakefiri*). Le pangénome, soit l'ensemble des gènes retrouvés au sein du genre bactérien, équivaut à 45.000 familles de gènes différentes tandis que seuls 73 gènes sont dédiés à la croissance et à la réplication (ils représentent ainsi le génome central). Les caractéristiques génétiques de plusieurs espèces de Lactobacilles montrent la diversité du genre bactérien (**Tableau 3**). Ces observations sont également prouvées par les calculs de l'identité totale des nucléotides (Total Nucleotide Identity, TNI). En effet, la TNI moyenne entre toutes les espèces du genre *Lactobacillus* équivaut à 13,97 %, cela implique que même si les Lactobacilles ont été historiquement définis comme un genre, leur diversité génétique est bien supérieure à celle d'une famille phylogénétique typique (Sun *et al.*, 2015). Ces études suggèrent la présence de nombreuses propriétés au sein du genre *Lactobacillus*, ceci du point de vue de leur composition pariétale ou de leur métabolisme.

Tableau 3 : Caractéristiques génomiques des principales espèces de *Lactobacilles*.
D'après Stefanovic *et al.*, (2017). Données de Juillet 2016.

Espèces	Nombre de séquences disponibles	Taille moyenne du génome (Mpb)	Nombre moyen de protéines	Pourcentage de GC moyen
<i>L. delbrueckii</i>	32	1,865	1.637	49,8
<i>L. helveticus</i>	22	2,077	1.784	36,8
<i>L. casei</i>	35	3,036	2.736	46,4
<i>L. paracasei</i>	53	2,961	2.749	46,3
<i>L. acidophilus</i>	16	1,979	1.815	34,6
<i>L. rhamnosus</i>	102	2,937	2.641	46,6
<i>L. plantarum</i>	114	3,275	2.912	44,4

3.3. De potentiels sources d'ingrédients santé

Les *Lactobacilles* sont couramment utilisés dans l'industrie agro-alimentaire, cependant ces organismes ont démontré depuis quelques années leurs potentielles applications santé. Ces souches aux métabolismes variés sont en effet capables de produire un large panel de molécules aux propriétés différentes. Dans ce contexte, selon l'inventaire des cultures alimentaires microbiennes (Inventory of Microbial Food Culture, MFC) réalisé en 2011-2012, les *Lactobacilles* représentent 43 % (84 espèces) du nombre total de microorganismes ayant une utilisation bénéfique certifiée (sur un total de 195 espèces représentant 28 genres des phylums *Actinobacteria*, *Firmicutes* et *Proteobacteria*) (Bourdichon *et al.*, 2012; Salvetti & O'Toole, 2017). En effet, les souches de *Lactobacilles* peuvent être utilisées dans le cadre de nombreuses applications santé.

3.3.1. La production d'exopolysaccharides

Les exopolysaccharides sont de longues chaînes de polysaccharides constituées d'unités répétées de sucres ou de leurs dérivés branchées entre eux. Ces unités de sucres sont principalement du glucose, du galactose et du rhamnose en différents ratios. Ces molécules sont retrouvées au niveau de la paroi bactérienne mais elles peuvent également être sécrétées dans le milieu extérieur. Leur synthèse a premièrement lieu dans le cytoplasme à partir d'une étape de la glycolyse. Le glucose-6-phosphate est d'ailleurs un carrefour métabolique entre la glycolyse et la synthèse d'exopolysaccharides. Les sucres sont ensuite activés, puis transportés à l'extérieur de la cellule où ils seront polymérisés. Les exopolysaccharides interviennent dans

l'interaction des cellules bactériennes avec différentes surfaces ou dans l'agrégation bactérienne mais ils servent également de protection de la cellule vis-à-vis de l'environnement ou de stress (Welman & Maddox, 2003).

Chez les Lactobacilles, plusieurs types d'exopolysaccharides ont été caractérisés avec des structures variées. Les exopolysaccharides sont divisés en homo et hétéropolysaccharides, les premiers étant constitués d'un seul type de sucre tandis que plusieurs sucres peuvent être retrouvés chez les hétéropolysaccharides. Ils sont produits par fermentation du lait ou de milieux synthétiques à base de glucose, à des températures allant de 30 à 37°C en condition de pH contrôlé pour éviter leur dégradation suite à l'acidification. Ces molécules sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire comme agents de texture notamment dans les produits laitiers, mais elles peuvent également présenter certaines activités biologiques d'intérêts comme des activités antimicrobiennes, antivirales, immunomodulatrices ou hypocholestérolémiantes (Badel *et al.*, 2011; Jeong *et al.*, 2017; Nagai *et al.*, 2011). L'exopolysaccharide le plus connu au sein du genre *Lactobacillus* est le kéfiran, produit par des souches de *L. kefiranofaciens* isolées de grains de kéfir. Cette macromolécule est constituée d'une chaîne de résidus de glucose et de galactose présentant un poids moléculaire variable compris entre 1.000 et 4.000 kDa (**Figure 19**) (Furuno & Nakanishi, 2012).

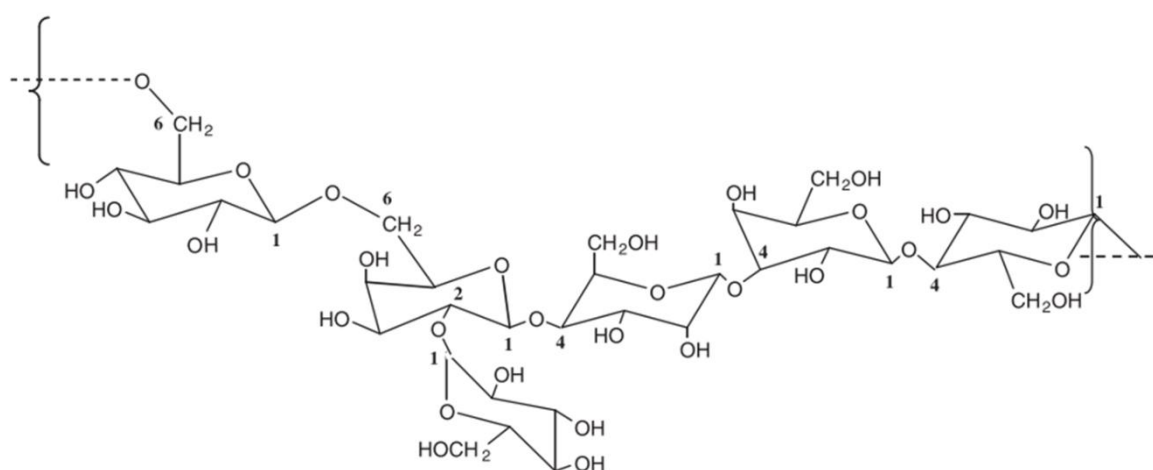


Figure 19 : Structure du kéfiran.
D'après Badel *et al.*, (2011).

Au-delà de leurs propriétés intrinsèques, les exopolysaccharides peuvent également faire l'objet d'applications santé de par leur impact bénéfique sur le microbiote intestinal. Ils peuvent prévenir l'adhésion de certains pathogènes à la muqueuse intestinale ou encore agir en tant que prébiotiques et ainsi être métabolisés par certaines communautés du microbiote qui auront en

retour un effet bénéfique sur la santé de l'hôte (Marco *et al.*, 2017). Néanmoins, les exopolysaccharides issus de Lactobacilles sont encore peu utilisés à ce jour pour des applications santé. Ceci s'explique principalement par les faibles rendements de production par ces souches qui limitent l'exploitation commerciale des polysaccharides. De futurs travaux utilisant l'ingénierie métabolique permettront d'accroître les capacités de production et ainsi de développer l'utilisation des Lactobacilles pour la production d'exopolysaccharides (Badel *et al.*, 2011).

3.3.2. La synthèse de vitamines

Les vitamines sont des micronutriments impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques essentielles dont le métabolisme cellulaire, la synthèse d'acides nucléiques ou les fonctions antioxydantes. La plupart de ces vitamines ne peuvent être synthétisées par l'homme, un apport exogène est donc nécessaire via le microbiote intestinal ou l'alimentation. Parmi ces vitamines, celles du groupe B jouent un rôle majeur dans la production d'énergie ou dans la formation des globules rouges. Elles sont présentes dans de nombreux aliments mais peuvent être facilement dégradées ou perdues durant les procédés alimentaires comme la cuisson. Ainsi une déficience en vitamines du groupe B est souvent rencontrée dans de nombreuses sociétés (Capozzi *et al.*, 2012; Leblanc *et al.*, 2011).

Les bactéries lactiques et en particulier certaines espèces de Lactobacilles, sont capables de synthétiser des vitamines du groupe B. Ces souches représentent des alternatives de production naturelles et économiques de vitamines.

La riboflavine (vitamine B2) est essentielle à la synthèse d'enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique des cellules. Certaines souches de Lactobacilles sont capables de synthétiser cette molécule à partir de la guanosine triphosphate et du D-ribulose-5-phosphate. La synthèse microbienne de riboflavine dépend de 4 gènes (*ribA*, *ribB*, *ribG* et *ribH*), ces gènes sont représentés de différentes façon selon les espèces et souches du genre *Lactobacillus* (Thakur *et al.*, 2016). A titre d'exemple, la souche *L. plantarum* CRL 725 a été utilisée afin d'optimiser sa production de riboflavine dans un milieu semi-défini, la concentration en riboflavine après 24 h de culture est équivalente à 5,7 ng.mL⁻¹ (Juarez del Valle *et al.*, 2017). La souche *L. fermentum* MTCC 8711 produit 2,2 mg.L⁻¹ de riboflavine après culture dans un milieu défini pendant 24 h (Leblanc *et al.*, 2011). A l'inverse, les souches DPC 4571 et H10 de *L. helveticus* sont incapables de synthétiser la riboflavine (Thakur *et al.*, 2016).

Le folate (vitamine B9) est impliquée dans la réplication, réparation et méthylation de l'ADN ainsi que la synthèse d'acides nucléiques (Leblanc *et al.*, 2011). Cette vitamine intervient également dans le métabolisme du calcium, elle est donc essentielle pour la formation osseuse (Parvaneh *et al.*, 2014). Le folate est formé par la liaison du 6-hydroxyméthyl-7,8-dihydroptérine pyrophosphates (DHPPP) avec l'acide para-amino-benzoïque (para-aminobenzoic acid, pABA), ainsi la synthèse *de novo* de folate nécessite la production de ces deux composants. Excepté quelques souches de *L. plantarum*, la plupart des souches de Lactobacilles sont incapables de synthétiser la vitamine B9 du fait de l'absence de la voie de biosynthèse de pABA (Li *et al.*, 2016). Cependant certaines souches sont capables de produire du DHPPP et du folate en cas de supplémentation du milieu en pABA, c'est le cas des souches de *L. sakei*, *L. delbrueckii*, *L. reuteri*, *L. helveticus* et *L. fermentum* (Rossi *et al.*, 2011). Des stratégies de supplémentation ou encore de co-cultures peuvent être envisagées. En effet les genres *Lactococcus* ou *Streptococcus* sont capables de produire le pABA. Dans ce contexte, la souche *L. amylovorus* CRL 887 a été cultivée en présence des souches *L. delbrueckii* CRL 871, *S. thermophilus* CRL 803 et CRL 415 afin de produire un yaourt contenant 263 µg.L⁻¹ de folate (Laiño *et al.*, 2014).

La cobalamine (vitamine B12) est la seule vitamine à être produite uniquement par des microorganismes en particulier par les anaérobies. Chez l'homme, une déficience en cobalamine entraîne différentes manifestations pathologiques affectant les systèmes hématopoïétique, cardiovasculaire et neurologique. Il existe à ce jour, deux espèces de Lactobacilles capables de synthétiser *de novo* la cobalamine, la souche *L. reuteri* CRL 1098 fut la première bactérie lactique pour laquelle une synthèse de vitamine B12 a été mise en évidence (Leblanc *et al.*, 2011). Par ailleurs, une souche de *L. coryniformis* CRL 1001 est capable de produire une pseudo-cobalamine après culture dans un milieu minimum (Torres *et al.*, 2016).

En résumé, les Lactobacilles représentent de potentiels producteurs de vitamines du groupe B. Cette capacité est néanmoins espèce voire souche dépendante, de futurs travaux permettront de mettre en évidence des souches capables de produire des quantités significatives de vitamines soit au sein du microbiote intestinal soit par procédé de fermentation.

3.3.3. La production de peptides bioactifs

Comme il a été mentionné précédemment, les Lactobacilles possèdent un système protéolytique particulier afin de subvenir à leurs besoins en acides aminés. La protéolyse réalisée par les bactéries dans leur milieu extérieur conduit à la génération de nombreux peptides qui peuvent présenter certaines activités biologiques.

Le chapitre 4 a pour sujet la production de peptides bioactifs par les Lactobacilles, ce domaine sera détaillé lors d'une introduction qui sera suivie des travaux réalisés au cours de ce projet de thèse. Ces travaux ont été conduits afin de mettre en évidence des souches capables de produire des peptides bioactifs par fermentation du lait.

3.3.4. L'utilisation en tant que probiotiques

Outre la production de molécules aux effets bénéfiques, les Lactobacilles peuvent être utilisés en tant que tel comme probiotiques. Ces organismes sont capables de rejoindre l'intestin et d'agir via différents mécanismes pour conférer un effet bénéfique à leur hôte. De par leur occurrence naturelle dans les produits alimentaires et le microbiote intestinal, les Lactobacilles sont largement étudiés pour leur potentiel probiotique.

L'utilisation des Lactobacilles comme probiotiques constitue une partie de ce projet de thèse, partie qui fait l'objet du chapitre 3 de ce manuscrit. Après une introduction sur les probiotiques, les résultats concernant cette partie seront présentés. L'objectif étant de mettre en évidence des souches pouvant être utilisées en tant que probiotiques.

IV. Conclusion

En conclusion, les nombreuses causes métaboliques entraînant un syndrome ostéoporotique montrent les différentes cibles thérapeutiques potentielles afin de prévenir l'apparition de la maladie. Au regard des différentes études, il semble que l'intestin joue un rôle primordial dans l'initiation de signaux impactant positivement ou négativement la santé osseuse.

Les traitements contre l'ostéoporose n'ont vu le jour que très récemment. Leur efficacité est établie mais de nombreuses inquiétudes persistent aujourd'hui vis-à-vis de leur innocuité. C'est pourquoi, des approches préventives sont maintenant envisagées. Elles sont non spécifiques à l'ostéoporose car elles visent un maintien et/ou la prévention de perturbations du métabolisme dans sa globalité. Ainsi des modifications alimentaires ou encore l'activité physique permettent de maintenir le métabolisme et prévenir son déclin progressif au cours du vieillissement. Ces changements permettront de réduire l'occurrence précoce de maladies comme le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires et l'ostéoporose.

Dans ce contexte, parmi d'autres alternatives les Lactobacilles constituent une source prometteuse d'ingrédients et d'aliments santé. Ces souches sont en effet capables de produire différentes molécules bioactives et elles peuvent également exercer une action probiotique. Ce genre bactérien est caractérisé par une large diversité génétique et métabolique, et son utilisation de longue date par l'homme montre son innocuité pour le développement d'applications santé.

Chapitre 2

Matériels et méthodes

I. Une collection de bactéries lactiques isolées en Mongolie

Pour cette étude, les souches de la collection proviennent de 3 régions différentes de la Mongolie (**Figure 20**) : les chaines montagneuses de l'Altaï à l'ouest, une région au climat semi-aride, la région de l'Hangai au nord, région de forêts et de steppes au climat continental et enfin le désert de Gobi au sud. Les échantillons sont récoltés à partir de produits laitiers issus de la production de différentes familles nomades à savoir : des laits fermentés de chamelle, jument ou dri, ainsi que des yaourts issus de laits de chèvre, vache, dri, d'un mélange vache et dri ou encore de hainag (un croisement entre une vache et un yak).

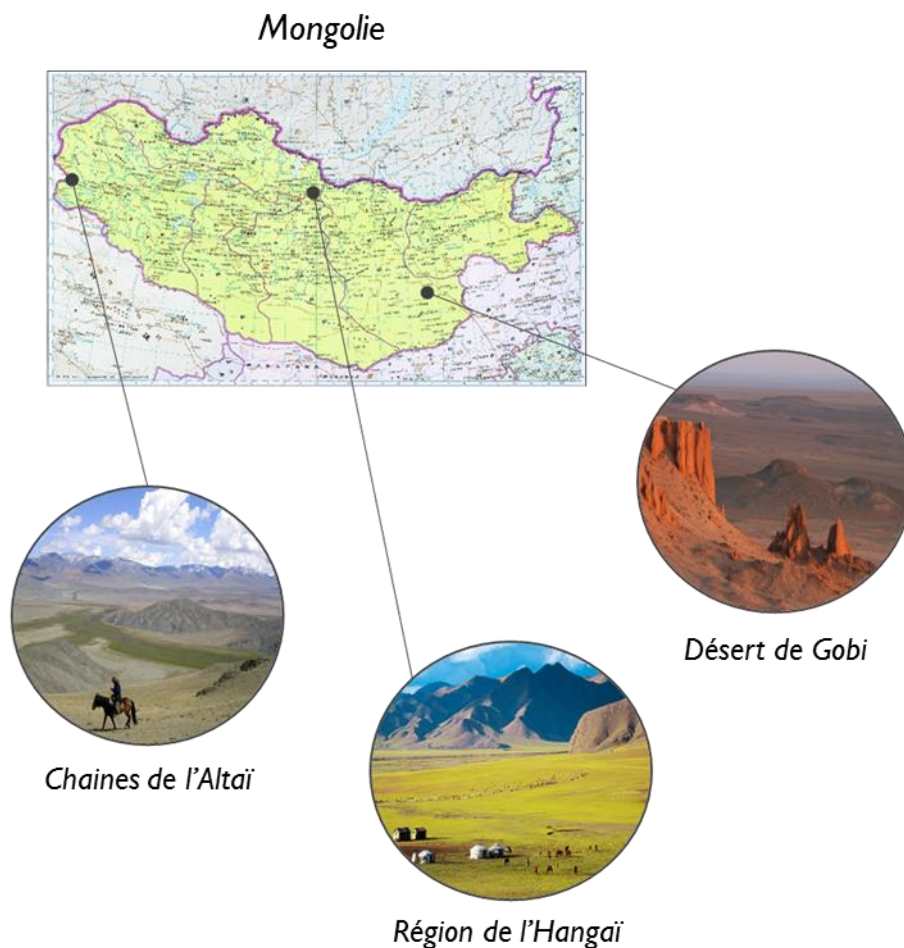


Figure 20 : Origines des différents produits laitiers récoltés par la société VF Bioscience pour la constitution de la collection de souches.

La récupération des échantillons ainsi que l'isolement et l'identification des souches ont été réalisés par la société VF Bioscience en 2014-2015. Un total de 69 échantillons de produits laitiers a été collecté dans les 3 régions en Mongolie sus-indiquées à partir desquels 174 souches ont été isolées. Chaque souche est codée selon un numéro N suivi d'une lettre x. Avec N correspondant au numéro du produit d'origine collecté (de 1 à 69) et x correspondant à l'isolat obtenu à partir de cet échantillon (de a à e).

Parmi les 174 souches identifiées on compte 12 espèces différentes avec près de 94 % des souches de la collection qui font partie du genre *Lactobacillus*. On note ainsi la présence de souches de *L. helveticus*, *L. delbrueckii* ss. *bulgaricus* (*L. delbrueckii*), *L. kefiranofaciens*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. kefiri*, *Leuconostoc lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *L. casei*, *L. acidophilus* et de *Pediococcus pentosaceus* par ordre d'importance (**Figure 21**).

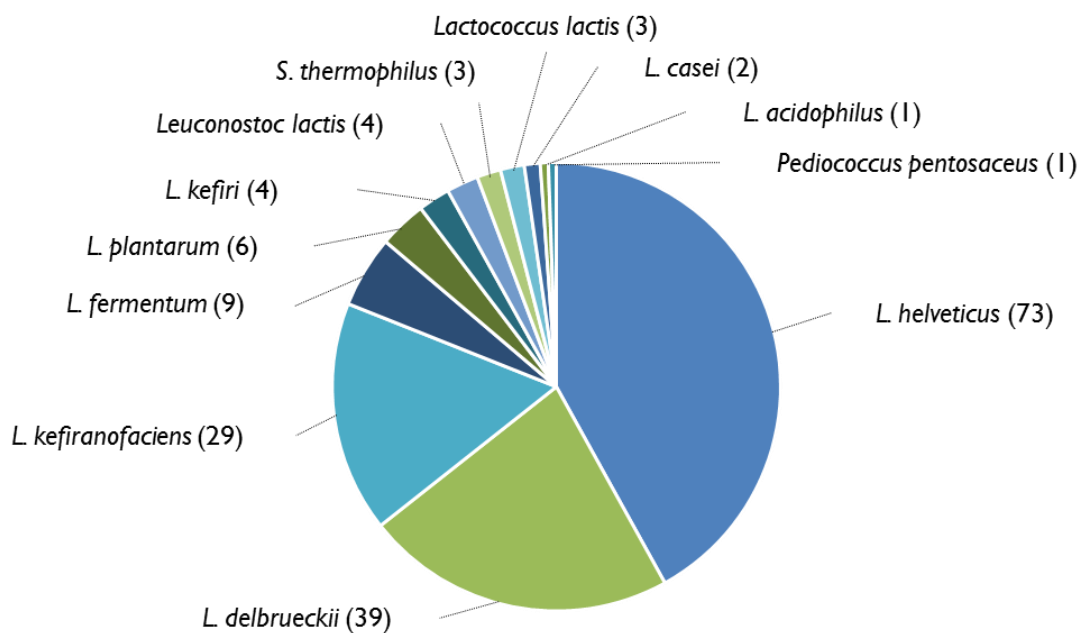


Figure 21 : Abondance des espèces bactériennes (nombre d'isolats) dans la collection de souches isolées en Mongolie et identifiées par séquençage de l'ADNr 16S.

II. Criblages de la collection

Deux criblages indépendants ont été réalisés afin de sélectionner à la fois des souches potentiellement probiotiques, et des souches ayant d'importantes activités protéolytiques pour la production de peptides bioactifs.

1. Sélection de souches potentiellement probiotiques

La sélection de souches potentiellement probiotiques a été réalisée en étudiant deux caractères : la tolérance à l'acidité et la détermination de l'hydrophobie pariétale des souches. La combinaison de ces deux traits a été utilisée pour sélectionner les souches pour la suite du projet.

1.1. Selon la tolérance à l'acidité

Pour cette expérience, chaque souche de la collection a été cultivée en milieu MRS (De Man, Rogosa et Sharpe, De Man *et al.*, 1960) liquide pendant 24 h à 37°C en condition anaérobie. Un volume de 200 µL de culture a ensuite été dilué (1/10) soit dans le même milieu MRS à pH 6,2 (appelé tube A), soit dans un milieu MRS ajusté à pH 2 par de l'acide chlorhydrique (HCl) (appelé tube B). Les tubes A et B ont été incubés à 37°C pendant 2 h puis 10 µL de chaque tube ont été étalés sur gélose MRS. Les boîtes ensemencées ont été incubées pendant 48 h à 37°C en condition anaérobie.

La tolérance à l'acidité a été évaluée en comparant les nombres de colonies entre les boîtes A et B. Les souches ont été réparties en différentes classes de tolérance à l'acidité selon le résultat du ratio B/A. La classe 0 regroupe les souches non tolérantes à l'acidité (aucune colonie sur la boîte B). La classe 1 correspond aux souches faiblement tolérantes (boîte B = 0 à 30 % des colonies sur la boîte A). La classe 2 regroupe les souches présentant une tolérance à l'acidité modérée (boîte B = 30 à 80 % des colonies sur la boîte A). Enfin la classe 3 correspond aux souches tolérantes à l'acidité (boîte B présente plus de 80 % des colonies de la boîte A).

1.2. Selon l'hydrophobie pariétale

Ce critère est évalué par un test MATS (Microbial Adhesion To Solvents) décrit par (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996). Pour l'expérience, les souches de la collection ont été cultivées en milieu MRS liquide pendant 24 h à 37°C en condition anaérobie. Les cellules sont ensuite lavées deux fois en répétant successivement une étape de centrifugation à $13.000 \times g$ pendant 10 min, suivi d'une étape de resuspension des cellules dans un tampon Phosphate Buffered Saline (PBS)

composé de NaCl (8 g.L⁻¹), de Na₂HPO₄ (1,24 g.L⁻¹), de KH₂PO₄ (0,24 g.L⁻¹), et de KCl (0,2 g.L⁻¹), à pH 7,4.

La Densité Optique (DO) à 630 nm (DO_{630nm} initiale) a été déterminée au spectrophotomètre ELx808 (BioTek Instruments Inc., Vermont, Etats-Unis). Un volume de 1 mL de suspension a ensuite été mélangé avec 100 µL de n-hexadécane (Acros Organics, Geel, Belgique) en vortexant le mélange pendant 1 min. La solution a ensuite été mise au repos à température ambiante pendant 15 min puis 100 µL de la phase aqueuse ont été récupérés pour une nouvelle détermination de la DO à 630 nm (DO_{630nm} finale). L'hydrophobie pariétale des souches a été calculée selon la formule suivante :

$$\%H = \left(\frac{DO_{630nm} \text{ initiale} - DO_{630nm} \text{ finale}}{DO_{630nm} \text{ initiale}} \right) \times 100$$

Avec %H : le pourcentage d'hydrophobie pariétale, DO_{630nm} initiale : la DO initiale de la suspension et DO_{630nm} finale : la DO mesuré après ajout et mélange de la suspension avec le n-hexadécane.

2. Sélection de souches protéolytiques selon la méthode des géloses au lait

Les géloses au lait sont préparées en mélangeant dans l'eau une poudre de lait écrémé (Sigma-Aldrich, St Louis, Etats-Unis) à une concentration de 5 % (m/v) supplémenté d'agar à 1,5 % (m/v). Après stérilisation à 110°C pendant 10 min, le lait est coulé dans des boîtes de Pétri. Des puits de 4 mm de diamètre sont ensuite formés dans la gélose.

Les souches de la collection ont été cultivées en milieu MRS liquide pendant 48 h à 37°C en condition anaérobie. Les cellules bactériennes sont lavées deux fois dans du milieu MRS puis finalement resuspendues dans un volume de milieu permettant d'obtenir une DO à 600 nm égale à 1 (spectrophotomètre Prim, Secomam, Groupe Aqualabo, Champigny, France). Un volume de 20 µL de la suspension bactérienne est déposé dans les puits de gélose au lait. Les plaques inoculées ont ensuite été incubées pendant 72 h à 37°C en condition anaérobie.

L'activité protéolytique des souches a été quantifiée en mesurant le diamètre (exprimé en mm) des halos apparus autour des puits après incubation (**Figure 22**).

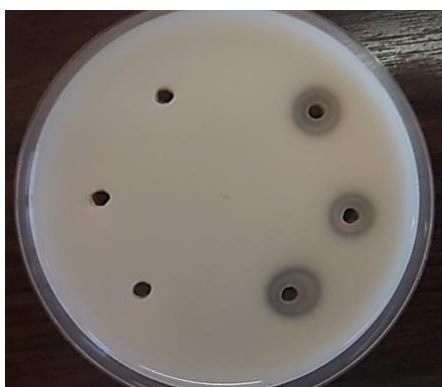


Figure 22 : Gélose au lait utilisée pour le criblage de la collection.

A gauche : trois puits non inoculés (contrôle), à droite : trois puits inoculés avec apparition d'un halo de protéolyse après incubation.

III. Etude des caractères probiotiques

A partir des souches potentiellement probiotiques sélectionnées selon les criblages, différents critères sont ensuite étudiés. Ces critères regroupent différentes caractéristiques définissant les probiotiques notamment la capacité d'adhésion à l'épithélium intestinal, l'innocuité des souches ainsi que leur tolérance à la digestion gastro-intestinale (DIG).

1. Géotypage des souches par REP-PCR

Afin de caractériser les souches sélectionnées, un géotypage est réalisé par la technique de REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic Polymerase Chain Reaction), en utilisant une amorce unique 5'-(GTG)₅-3'.

L'extraction de l'ADN des souches est réalisée à partir d'une culture MRS de 24 h, les cellules bactériennes sont lavées deux fois dans un tampon PBS puis récupérées par centrifugation à $13.000 \times g$ pendant 10 min. L'ADN est ensuite extrait et isolé en utilisant le kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Madison, Etats-Unis).

La réaction de REP-PCR est conduite dans un volume final de 25 μ L contenant 12,5 μ L de PCR Master Mix (2 $\times$) (ThermoFisher Scientific, Waltham, Etats-Unis), 5 μ L de l'amorce 5'-(GTG)₅-3' (10 μ M), 1 μ L d'ADN bactérien extrait (environ 200 ng. μ L⁻¹) et 6,5 μ L d'H₂O. Les cycles PCR sont réalisés dans un thermocycler labcycler (SensoQuest, Göttingen, Allemagne). Après une première dénaturation à 95°C pendant 7 min, 30 cycles de PCR sont répétés successivement, un cycle se compose d'une dénaturation à 95°C pendant 30 sec, d'une hybridation à 40°C pendant 1 min et d'une élongation à 65°C pendant 8 min. Une dernière élongation à 65°C pendant 16 min a lieu après les 30 cycles PCR.

Les produits de REP-PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % (m/v) préparé dans un tampon TBE (Tris, Borate, Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid (EDTA)) composé de Tris (90 mM), d'acide borique (90 mM) et d'EDTA (2 mM) à pH 8,8. La révélation des fragments d'ADN est réalisée par l'ajout dans le gel de 0,008 % (v/v) de GelRed® (10.000 $\times$) (Biotium, Fremont, Etats-Unis). Dix μ L de produits PCR sont mélangés avec 4 μ L de tampon de charge (6 $\times$) (ThermoFisher Scientific, Waltham, Etats-Unis) avant d'être déposé sur le gel d'agarose. Le mélange O'GeneRuler DNA Ladder Mix (ThermoFisher Scientific, Waltham, Etats-Unis) est utilisé comme marqueur de taille. La migration a lieu pendant 6 h à un voltage constant de 75 V. Les produits d'amplification sont visualisés à l'aide d'un Gel Doc™ (Bio-Rad, Hercules, Etats-Unis).

Les images des gels sont analysés par le logiciel PyElph (Pavel & Vasile, 2012) (version 2.6.5.) qui permet d'extraire automatiquement les signaux d'amplification et de comparer les différents profils ADN à partir d'une photo du gel pour ainsi générer des arbres phylogénétiques.

L'appariement des signaux est réalisé en fixant une distance maximale entre les bandes de 2 % de la taille de l'image. Après appariement des bandes, le logiciel génère une matrice numérique du gel en se basant sur la présence/absence des produits d'amplification. Les profils des différentes souches sont ensuite comparés deux à deux en utilisant le coefficient de corrélation Dice (CD). Ainsi la corrélation entre un profil A et B est donc exprimée par la relation :

$$CD = \frac{2 \times \text{Nb de bandes communes entre A et B}}{\text{Nb de bandes A} + \text{Nb de bandes B}}$$

L'arbre phylogénétique est ensuite généré par la méthode d'Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA). Cette méthode conduit à un arbre non enraciné, la distance entre les souches inscrite sur chaque branche est calculée à partir du CD selon la relation :

$$\text{Distance} = \frac{(1 - CD)}{2}$$

2. Test d'auto-agrégation

Le protocole a été décrit par Kotzamanidis *et al.*, (2010), les souches sont cultivées en MRS pendant 24 h à 37°C puis lavées et resuspendues dans un tampon PBS à une DO à 600 nm de 1. Un volume de 4 mL de suspension est vortexé pendant 10 sec puis incubé à température ambiante sans agitation. Après 2,5 et 5 h d'incubation, 100 µL de milieu sont soigneusement prélevés à la surface de la suspension. Les échantillons prélevés sont ensuite dilués (1/10) dans du tampon PBS pour une mesure de la DO à 600 nm.

Le pourcentage d'auto-agrégation des souches (%A) est ensuite calculé selon la relation :

$$\%A = \left(1 - \frac{A_t}{A_0}\right) \times 100$$

Avec A_0 : l'absorbance à 600 nm initiale de la suspension, mesurée au début de l'expérience (et égale à 1) et A_t : l'absorbance à 600 nm mesurée à 2,5 ou 5 h d'incubation.

3. Evaluation de la tolérance à la digestion gastro-intestinale

Afin d'évaluer la survie des souches pendant et après leur passage au sein du tube digestif, un modèle de digestion statique a été utilisé. Ce modèle s'inspire des travaux de Belguesmia *et al.*,

(2016), il modélise les 3 compartiments principaux du tube digestif à savoir la bouche, l'estomac et l'intestin de façon séquentielle. Chaque compartiment est simulé par l'ajout d'un fluide mimant les conditions physiologiques de cette étape. L'ensemble de la digestion est réalisé en condition stérile, tous les fluides sont autoclavés à 121°C pendant 20 min avant l'expérience, l'ajout des enzymes a lieu après stérilisation et est suivi d'une filtration stérilisante (à 0,2 µm).

Les souches sont cultivées dans un milieu MRS pendant 24 h à 37°C. Les cellules bactériennes sont lavées deux fois puis resuspendues dans un tampon PBS à une concentration de 10^9 Colony Forming Unit (CFU). mL⁻¹. Pour la digestion, la phase buccale est simulée par l'addition de 8 mL de PBS, ajusté à pH 6,8, à 1 mL de la suspension bactérienne. Le mélange est incubé sous une agitation constante à 200 rpm pendant 5 min à 37°C. La phase gastrique est simulée par l'ajout de 12 mL de PBS à pH 3 supplémenté de pepsine bovine (Sigma-Aldrich, St Louis, Etats-Unis) à 1,56 mg.mL⁻¹. La suspension est incubée 2 h à 37°C en agitation à 200 rpm. Durant l'incubation, le pH de la solution est maintenu entre 3 et 3,5 par l'addition d'acide chlorhydrique (HCl) (1 M) ou d'hydroxyde de sodium (NaOH) (1 M). Pour la phase intestinale, 1 mL de carbonate de sodium (NaHCO₃) à 1 M est ajouté au mélange afin de remonter le pH à environ 7 et inactiver la pepsine. Un volume de 12 mL de PBS à pH 8,2 supplémenté des enzymes pancréatiques bovines (Sigma-Aldrich, St Louis, Etats-Unis) à 0,28 mg.mL⁻¹, puis un volume de 6 mL de PBS à pH 8,1 contenant 60 g.L⁻¹ d'Ox-bile (Sigma-Aldrich, St Louis, Etats-Unis) sont ajoutés au mélange afin de simuler les conditions intestinales. Cette étape se déroule pendant 2 h à 37°C en agitation à 200 rpm en maintenant le pH entre 7 et 7,5.

A la fin de chaque étape de la digestion, un prélèvement de 100 µL du mélange réactionnel est réalisé, ainsi pour une même digestion, 4 échantillons sont obtenus comprenant le prélèvement du tube mère (TM), de la phase salivaire (S), de la phase gastrique après 2 h d'incubation (G2), et enfin celui après 2 h de phase intestinale (I2). Chaque prélèvement est ensuite dilué (1/10) successivement dans un tampon PBS. Pour la détermination de la concentration bactérienne dans les échantillons, 100 µL des dilutions adéquates sont étalés sur une gélose MRS. Les plaques ensemencées sont ensuite incubées à 37°C pendant 48 h en condition anaérobie. Après incubation, le dénombrement des CFU permet la détermination de la concentration bactérienne dans les échantillons. Les résultats sont exprimés en CFU.mL⁻¹.

4. Test de cytotoxicité

Ce test a pour objectif d'évaluer l'éventuelle toxicité des souches vis-à-vis de la barrière intestinale. Les cellules Caco-2 et HT-29 MTX sont utilisées dans ce but. Ces cellules sont des lignées cellulaires tumorales humaines isolées d'adénocarcinomes coliques (Fogh *et al.*, 1977; Fogh & Trempe, 1975). Les clones utilisés proviennent de l'ECACC (European Collection of Authenticated Cell Culture, Sigma-Aldrich, St Louis, Etats-Unis).

Durant ce projet, les cellules intestinales sont cultivées à 37°C, 5 % de CO₂, en milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), 100 U.mL⁻¹ de pénicilline, 100 µg.mL⁻¹ de streptomycine et 2 mM de L-glutamine (Dominique Dutscher, Brumath, France) (appelé DMEM complet). Une fois à confluence, les cellules sont trypsinisées et ensemencées dans des plaques selon les besoins de l'expérience. Un passage des cellules a lieu toutes les semaines et une flasque T75 est constamment maintenue.

Pour le test de cytotoxicité, les cellules sont ensemencées en plaque 96 puits à une densité de 8.000 cellules par puit dans un volume de 150 µL de milieu et cultivées pendant 7 jours à 37°C, 5 % de CO₂. Avant l'ajout des souches bactériennes, les cellules intestinales sont lavées deux fois avec du tampon PBS. Les souches bactériennes quant à elles, sont cultivées comme décrit précédemment et suspendues dans le milieu DMEM sans ajout à une concentration de 10⁷ CFU.mL⁻¹. Pour chaque puit, 150 µL de suspension bactérienne sont ajoutés. Du tampon PBS, dilué avec du DMEM sans ajout tout comme pour les souches, est utilisé comme contrôle négatif. Le contact entre les souches bactériennes et les cellules intestinales a lieu pendant 24 h à 37°C, 5 % de CO₂. Les souches sont mises en contact à la fois avec les cellules Caco-2 et les cellules HT-29 MTX de façon indépendante.

Après contact, 50 µL de surnageant sont prélevés dans chaque puit et l'activité lactate déhydrogenase (LDH) est dosée en suivant le protocole du kit LDH activity assay (Sigma-Aldrich, St Louis, Etats-Unis). L'absorbance de la plaque est lue à 450 nm par un spectrofluorimètre Xenius XC (Safas Monaco, Monaco, France). La mortalité des cellules intestinales est calculée en pourcentage de la moyenne des absorbances de la condition contrôle (la proportion de LDH libérée dans cette condition est prise pour référence à 100 %).

5. Evaluation de l'adhésion des souches aux cellules intestinales

Les souches sont cultivées et préparées comme décrit précédemment, une suspension en milieu DMEM sans ajout est préparée à une concentration de 10^7 CFU.mL⁻¹. Les cellules Caco-2 sontensemencées en plaques 24 puits à une concentration de 40.000 cellules par puit dans un volume de 500 µL de DMEM complet. Après incubation pendant 7 jours à 37°C, 5 % de CO₂, les cellules sont lavées deux fois avec un tampon PBS.

Un volume de 300 µL de suspension bactérienne est ajouté dans chaque puit, la plaque est ensuite incubée à 37°C, 5 % de CO₂, pendant 2 h. La suspension bactérienne utilisée est conservée pour détermination de la concentration en CFU. Après 2 h de contact, les cellules Caco-2 sont lavées deux fois avec du tampon PBS afin de retirer les bactéries non adhérentes. Les cellules intestinales sont ensuite lysées par l'ajout de 100 µL de tampon PBS supplémenté avec du Triton X-100 à 0,1 % (v/v). Après incubation pendant 15 min à température ambiante, le lysat et la suspension mère utilisée sont dilués successivement (1/10) en PBS, puis étalés sur une gélose MRS. Les plaquesensemencées sont incubées 48 h à 37°C en condition anaérobie. Après dénombrement et détermination de la concentration bactérienne en CFU.mL⁻¹, le pourcentage de cellules bactériennes adhérentes est calculé par rapport à la concentration obtenue dans la suspension mère représentant la quantité de bactéries ajoutée au début de l'expérience (fixée à 100 %).

IV. Etude de l'impact des souches sur le métabolisme du calcium et de la vitamine D

Cette partie s'intéresse à l'étude d'une potentielle activité biologique des souches sur les cellules de la barrière intestinale à savoir, l'impact des souches sur l'absorption minérale du calcium ainsi que sur le métabolisme de la vitamine D. Différentes techniques ont été employées comme la reverse transcriptase quantitative PCR (RT-qPCR) ou la spectrofluorimétrie en utilisant les deux lignées cellulaires Caco-2 et HT-29 MTX comme modèle *in vitro* de la barrière intestinale.

1. Protocole général de contact entre les souches bactériennes et les cellules intestinales

Ce protocole de contact est utilisé pour chaque technique employée dans cette partie. Les souches bactériennes sont cultivées en MRS pendant 24 h à 37°C en condition anaérobie. Les cellules sont récupérées par centrifugation à $13.000 \times g$ pendant 10 min puis resuspendues dans un tampon PBS, cette étape est répétée une seconde fois pour laver les cellules bactériennes. Une suspension bactérienne est finalement préparée avec du milieu DMEM sans ajout à une concentration de 10^7 CFU.mL⁻¹.

Les cellules HT-29 MTX sontensemencées en plaque 24 puits à une concentration de 40.000 cellules par puits dans un volume de 500 µL de DMEM complet. Les cellules Caco-2 sontensemencées en plaque 96 puits à une concentration de 8.000 cellules par puits dans un volume de 200 µL de milieu DMEM complet. Pour une autre expérience, les cellules Caco-2 sontensemencées sur inserts placés en plaque 12 puits (membrane en polyester, 0,4 µm, Costar®, Corning, New-York, Etats-Unis) côté apical dans un volume de 500 µL de milieu DMEM complet, un volume de 1.500 µL de ce même milieu est ajouté du côté basal de l'insert. Toutes les cultures cellulaires sont cultivées pendant 15 jours avec un renouvellement du milieu tous les 2 jours lors de la deuxième semaine de culture.

Les cellules intestinales sont lavées deux fois avec du tampon PBS avant le contact avec les souches bactériennes. Un volume de 150 µL de suspension bactérienne est ajouté dans chaque puit pour une culture en plaque 96 puits, et volume de 300 µL est quant à lui ajouté pour un contact en plaque 24 puits ou en inserts sur plaque 12 puits. Dans tous les cas, le contact a lieu pendant 24 h à 37°C, 5 % de CO₂. Le contrôle négatif utilisé est un tampon PBS dilué dans du milieu DMEM complet.

2. Mesure du transport total du calcium

Le transport total du calcium est défini comme étant la part de calcium passant du pôle apical au pôle basal en traversant la barrière épithéliale. Ce transport est évalué par la variation de la concentration en calcium au pôle basal de la barrière cellulaire au cours du temps. Les cellules Caco-2 cultivées en inserts en plaque 12 puits sont utilisées pour cette expérience.

Au début du contact avec les souches bactériennes ($t = 0$ h), 10 μ L d'une solution de chlorure de calcium (CaCl_2) à 250 mM sont ajoutés côté apical de l'insert. Durant le contact, des prélèvements de 100 μ L sont réalisés du côté basal de l'insert à 30 min, 7 et 24 h de contact. Les échantillons sont conservés à -20°C jusqu'à analyse.

Au moment des différents prélèvements, une mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER) est réalisée pour vérifier l'intégrité de la barrière de cellules Caco-2. Cette résistance est mesurée par un voltmètre/ohmmètre MilliCell Electrical Resistance System (Merck Millipore, Burlington, Etats-Unis). Un insert vide sans cellule est utilisé comme blanc pour obtenir la résistance de la barrière cellulaire. La résistance (en Ω) de chaque puit mesurée est ensuite multipliée par l'aire de l'insert (égale à 1,12 cm^2 pour l'insert utilisé) pour donner une résistance en $\Omega.\text{cm}^2$. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur obtenue à 30 min de contact (fixée à 100 %) pour chaque puit.

Afin de mesurer le transport total du calcium, un dosage de la concentration en calcium est réalisé dans les prélèvements réalisés au pôle basal de la membrane de cellules Caco-2 au cours du contact. La détermination de la concentration en calcium est réalisée en utilisant le kit calcium colorimetric assay (Sigma-Aldrich, St Louis, Etats-Unis). Le dosage est réalisé à partir de 25 μ L d'échantillons dilués (1/2) dans l' H_2O Milli-Q®, en suivant le protocole du kit. La mesure de l'absorbance des échantillons à 575 nm est réalisée par un spectrofluorimètre Xenius XC (Safas Monaco, Monaco, France). La concentration en calcium dans les échantillons est déterminée au moyen d'une gamme étalon de CaCl_2 , elle est ensuite exprimé en fonction du ratio de la concentration à l'instant t sur la concentration au temps $t = 30$ min de contact.

3. Mesure de l'incorporation du calcium au sein des cellules intestinales

Contrairement à l'expérience précédente, l'objectif ici est de déterminer la capacité des cellules à incorporer du calcium dans le compartiment intracellulaire. Le calcium incorporé est détecté par spectrofluorimétrie au moyen d'une sonde fluorescente présente dans le cytoplasme des cellules. Les cellules Caco-2ensemencées en plaques 96 puits sont utilisées pour cette expérience, après contact avec les souches bactériennes, les cellules sont lavées deux fois avec un tampon PBS avant d'incorporer la sonde fluorescente.

La molécule utilisée pour détecter le calcium est une sonde Green FluoForte® fournie avec le kit FluoForte® calcium assay (Enzo Life Sciences, Farmingdale, Etats-Unis). Cette sonde est ajoutée sur les cellules sous une forme estérifiée acetoxyméthyle (AM) non fluorescente, une fois incorporée, le groupement lipophile bloquant la fluorescence est clivé par des estérases cellulaires non spécifiques, ceci entraîne l'activation de la sonde qui va émettre une fluorescence une fois liée au calcium (**Figure 23**). Sous sa forme active la sonde ne peut être rejetée par les cellules du fait de la présence d'un inhibiteur d'efflux (ajouté au même moment).

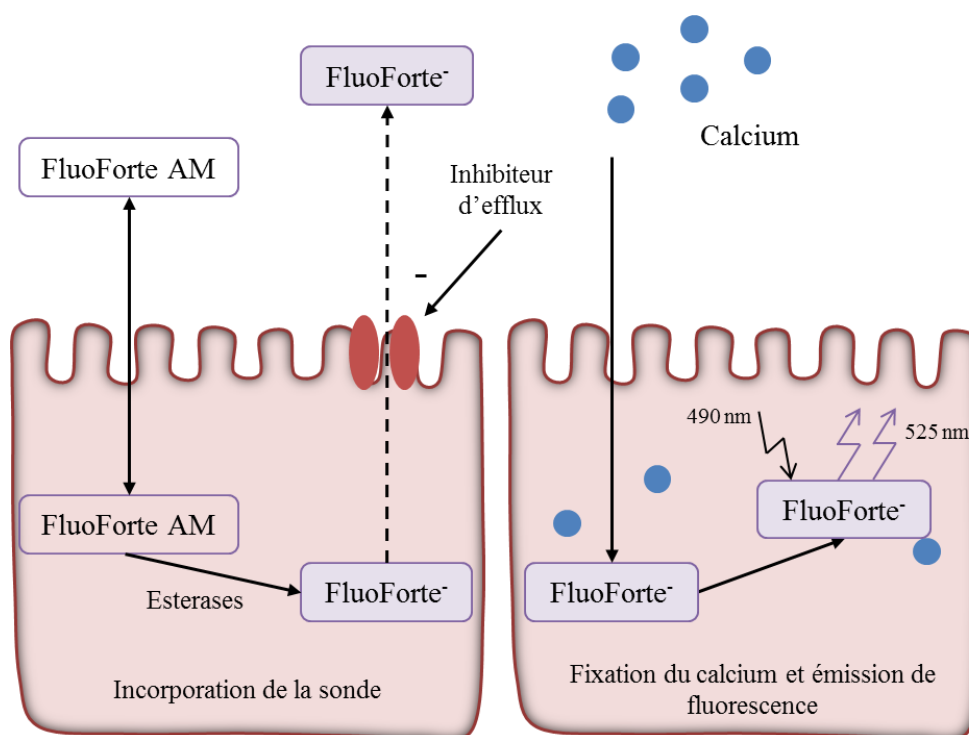


Figure 23 : Représentation schématique de l'incorporation de la sonde fluorescente FluoForte par les cellules Caco-2.

Après rinçage des cellules Caco-2, la sonde est ajoutée en suivant les instructions du kit, la plaque est ensuite incubée à température ambiante pendant 1 h le temps de pénétration de la sonde. L'émission de fluorescence est ensuite suivie par un spectrofluorimètre Xenius XC (Safas Monaco, Monaco, France) avec une longueur d'onde d'excitation à 490 nm pour une émission suivie à 525 nm. L'émission est mesurée pendant 30 sec avec une injection de 25 μ L d'une solution de CaCl_2 à 250 mM entre 9 et 10 sec de cinétique au moyen d'un module d'injecteurs couplé au spectrofluorimètre. Cette injection provoque une entrée brutale de calcium au sein des cellules intestinales ce qui conduit à une augmentation de l'émission de fluorescence. La capacité des souches bactériennes à moduler l'incorporation du calcium est déterminée par cette augmentation de fluorescence après injection du calcium. Les résultats sont ainsi exprimés pour chaque puits en fonction de la moyenne de fluorescence mesurée entre 0 et 9 sec de cinétique qui est considérée comme la fluorescence basale d'un puit. Un ratio d'augmentation de fluorescence, pour les différentes conditions de contact, est donc obtenu.

4. Etude de l'expression de différents gènes impliqués dans le métabolisme du calcium et de la vitamine D

Dans cette partie, les changements dans l'expression de plusieurs gènes après contact de 24 h entre les souches bactériennes et les cellules HT-29 MTX ont été étudiés. Le contact a eu lieu en plaque 24 puits comme décrit précédemment.

Après contact, les cellules HT-29 MTX sont rincées deux fois avec du tampon PBS. L'extraction des ARN est ensuite réalisée par le réactif TRIzol™ (Sigma-Aldrich, St Louis, Etats-Unis). Pour chaque puit, 100 μ L de réactif sont ajoutés, le tapis cellulaire est ensuite gratté et le volume de lysat est récupéré dans un tube Eppendorf. Un volume de 20 μ L de chloroforme est mélangé au lysat suivi d'une centrifugation à $13.000 \times g$ pendant 15 min à 4 °C. Un mélange hétérogène est obtenu après centrifugation, la fraction contenant les ARN, retrouvée à la surface de la suspension, est récupérée dans des nouveaux tubes. Les ARN sont précipités par l'ajout de 50 μ L d'isopropanol suivi d'une incubation à -20°C pendant au moins 12 h, les ARN sont ensuite récupérés par centrifugation à $13.000 \times g$ pendant 20 min à 4°C. Après avoir soigneusement retiré le surnageant, le culot est lavé par de l'éthanol à 70 % (v/v) dilué dans l' H_2O et l'étape de centrifugation est répétée une nouvelle fois. Le culot contenant les ARN est ensuite séché à l'air libre pendant 3/4 h et finalement resuspendu dans 11 μ L d' H_2O . La concentration et la pureté des échantillons d'ARN sont ensuite évaluées par un NanoDrop Lite

(ThermoScientific, Waltham, Etats-Unis) à partir d'1 μL d'échantillon. Les échantillons sont conservés à -80°C jusqu'à analyse.

Dans ce projet, les échantillons d'ARN ont d'abord été traités à la DNase. Un volume de 8 μL contenant 1.000 ng d'ARN est mélangé avec 1 μL de DNase, et 1 μL de tampon DNase (ThermoScientific, Waltham, Etats-Unis). La réaction a lieu à 37°C pendant 30 min dans un thermocycler Mastercycler gradient (Eppendorf, Hambourg, Allemagne), elle est stoppée par l'ajout d'1 μL de solution d'EDTA à 50 mM (ThermoScientific, Waltham, Etats-Unis) suivi d'une incubation à 65°C pendant 10 min.

Par la suite, les échantillons ont été rétro-transcrits en ADNc en utilisant le kit RevertAid H minus first strand cDNA synthesis (ThermoScientific, Waltham, Etats-Unis), pour un volume de 11 μL d'échantillon traité à la DNase, un volume de 9 μL de mélange RT est ajouté contenant 4 μL de tampon de réaction ($5\times$), 1 μL d'amorces hexamères aléatoires (random hexamer primers) (100 μM), 2 μL d'un mélange de désoxyribonucléotides (dNTP) (10 mM), 1 μL de transcriptase inverse (RevertAid H Minus M-MuLV reverse transcriptase) ($200\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 0,5 μL d'inhibiteur de RNases (RiboLock RNase inhibitor) ($20\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) et 0,5 μL d' H_2O . La réaction s'est déroulée dans un thermocycler Mastercycler gradient (Eppendorf, Hambourg, Allemagne), avec trois étapes successives d'incubation, 5 min à 25°C puis 1 h à 42°C et enfin 5 min à 70°C . Une réaction sans transcriptase inverse (noRT) est réalisée à partir d'un pool des échantillons d'ARN afin de contrôler l'efficacité de la RT, l'enzyme est alors remplacée par de l' H_2O .

Pour la réaction de qPCR, les échantillons d'ADNc sont dilués (1/16) dans l' H_2O . Pour un volume de 2 μL d'échantillon, 18 μL de mélange qPCR sont ajoutés contenant 10 μL de Power SYBR® Green PCR Master Mix ($2\times$) (Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, Etats-Unis), 0,6 μL de chaque amorce (10 μM) et 6,8 μL d' H_2O . La fluorescence est suivie pendant la réaction dans un thermocycler CFX Connect Real Time Detection System (Bio-Rad, Hercules, Etats-Unis). Après une étape de dénaturation à 95°C pendant 10 min, 40 cycles de PCR sont réalisés successivement, un cycle comprend une dénaturation à 95°C pendant 15 sec, une hybridation entre 58 et 61°C en fonction du couple d'amorces utilisé pendant 30 sec et une élongation à 72°C pendant 30 sec. La réalisation d'une courbe de fusion (melting curve) termine la réaction, il s'agit d'une mesure de la fluorescence sur un gradient de 60 à 95°C avec un pas de $0,5^{\circ}\text{C}$. Une gamme étalon est également réalisée à partir d'un pool de différents échantillons d'ADNc afin de vérifier l'efficacité de la réaction de qPCR.

Après réaction de qPCR, un cycle seuil (C_t) est déterminé pour chaque échantillon. L'expression d'un gène d'intérêt dans une condition donnée est exprimé en fonction de son expression dans la condition contrôle en utilisant la méthode du $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Le calcul du $\Delta\Delta C_t$ est défini par la relation :

$$\Delta\Delta C_t = (C_{t_{\text{échantillon}}} - C_{t_{\text{référence}}}) - (C_{t_{\text{échantillon}}} - C_{t_{\text{contrôle}}})$$

Avec $C_{t_{\text{échantillon}}}$: le cycle seuil obtenu pour le gène d'intérêt pour la condition traitée, $C_{t_{\text{référence}}}$: le cycle seuil obtenu pour le gène de référence en condition traitée et enfin $C_{t_{\text{contrôle}}}$: le cycle seuil obtenu pour le gène d'intérêt pour la condition contrôle (non traitée).

Dans cette partie, 4 gènes sont étudiés, il s'agit de deux gènes impliqués dans les jonctions serrés, le gène de la claudine 2 (*cld-2*) et celui de la claudine-4 (*cld-4*). Le gène codant pour le récepteur à la vitamine D (vitamin D receptor) (*vdr*) et enfin le gène codant pour le transporteur du calcium (transient receptor potential selective for calcium) (*trpv6*) également appelé CaT1 (calcium transporter 1). L'expression de ces gènes est normalisée par rapport à celle du gène codant pour la peptidylprolyl isomerase A (*ppiA*) pris pour référence (Domenger *et al.*, 2018). Les couples d'amorces utilisés pour les gènes étudiés, ainsi que leurs températures d'hybridation, sont présentés dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 : Amorces utilisées pour les expériences de qPCR.

Gène	Amorces (5'-3')	Taille de l'amplicon (pb)	Tm (°C)
<i>vdr</i>	Forward : GCCACCTGCTCTATGCCAAG Reverse : CAGGCTGTCCTAGTCAGGAGAT	171	61
<i>trpv6</i>	Forward : TGATGCGGCTCATCAGTGCCAGC Reverse : GTAGAAGTGGCCTAGCTCCTCG	251	58
<i>cld-2</i>	Forward : TGGCCTCTCTTGGCCTCCAACCTTG Reverse : TTGACCAGGCCTTGGAGAGCTC	638	60
<i>cld-4</i>	Forward : CCACTCGGACAACTTCCCAA Reverse : ACTTCCGTCCCTCCCCAATA	83	60
<i>ppiA</i>	Forward : TGCTGACTGTGGACAACCTCG Reverse : TGCAGCGAGAGCACAAAGAT	136	60

V. Analyse multiparamétrique de la protéolyse en lait écrémé

Afin de caractériser l'activité protéolytique des souches bactériennes, l'activité des souches sélectionnées suite au criblage sur gélose au lait est étudiée selon une analyse multiparamétrique. Cette analyse comprend différents critères liés à l'hydrolyse des protéines laitières par les bactéries.

1. Principe de l'analyse multiparamétrique

L'objectif de cette analyse est de pouvoir discriminer les souches sélectionnées au niveau de leurs activités protéolytiques. Il s'agit cette fois d'un test en milieu liquide où les cellules bactériennes sont mises en présence d'une protéine dont l'hydrolyse est analysée par différentes méthodes. Différentes caractéristiques plus ou moins liées à cette réaction enzymatique sont ainsi évaluées (**Figure 24**).

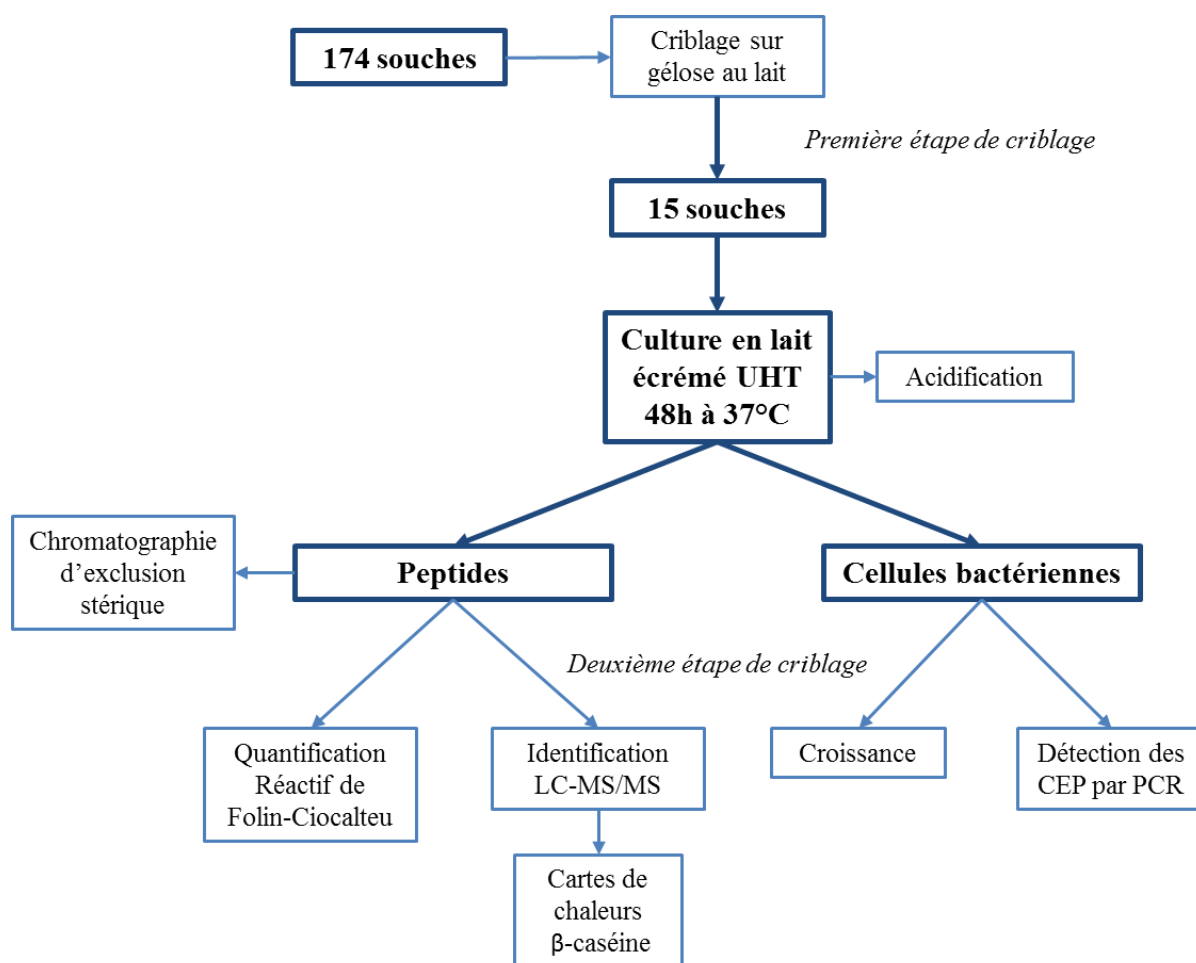


Figure 24 : Représentation de la stratégie de criblage des souches de la collection.

Après une première étape de criblage, 15 souches sont sélectionnées pour une analyse multiparamétrique de cultures en lait écrémé. Différents paramètres sont ainsi étudiés (croissance, acidification, détection des CEP et quantification, identification et répartition en poids moléculaire des peptides produits).

A partir d'une même culture en lait écrémé, la croissance et la capacité d'acidification des souches sont analysées et les protéases impliquées (CEP) sont identifiées. La production de peptides par les souches étant l'objectif principal de cette analyse, ces produits sont analysés par différentes méthodes à savoir, la quantification par dosage biochimique, l'étude de leur répartition en poids moléculaire apparent et enfin leur identification par spectrométrie de masse.

2. Cultures en lait écrémé

A partir d'une culture bactérienne en milieu MRS liquide, une pré-culture de 5 mL d'un milieu composé à 100 % de lait écrémé UHT (Cora, Paris, France) est réalisée pendant 72 h à 37°C en condition anaérobie.

Pour les cultures en lait écrémé, les souches sont inoculées dans le même milieu utilisé pour la pré-culture à une DO à 600 nm égale à 0,3 dans un volume final de 30 mL. Les cultures ont lieu pendant 48 h à 37°C en condition anaérobie. En tant que contrôle, le même milieu lait non inoculé est incubé dans les mêmes conditions.

A la fin de la fermentation, l'acidité du milieu est évaluée en mesurant le pH par un pH mètre (Mettler Toledo, Greifensee, Suisse), toutes les cultures sont ensuite conservées à -20°C jusqu'à analyse.

3. Etude du comportement des souches en lait écrémé

A partir des cultures en lait écrémé réalisées précédemment, la croissance des souches ainsi que les peptides produits sont analysés dans cette étude.

3.1. Mesure de la croissance bactérienne

La croissance des souches est déterminée après 48 h de culture par mesure de la DO à 600 nm. Les souches sont initialement ensemencées à une DO à 600 nm égale à 0,3.

Une mesure directe de la DO ne peut être réalisée pour une culture en lait à cause de l'opacité du milieu. Un protocole préalable de récupération des cellules bactériennes à partir de culture lait est donc réalisé (Abraham *et al.*, 1993). Afin de récolter les cellules à partir des cultures, un volume de 1 mL de culture est dilué (1/10) dans une solution d'EDTA 2 % (m/v) à pH 12, ceci afin de resuspendre complètement les caséines précipités. Les cellules sont ensuite récupérées par centrifugation à $13.000 \times g$ pendant 10 min. Ce protocole est répété une seconde fois et le culot bactérien obtenu est resuspendu dans 1 mL de tampon PBS. La DO à 600 nm est réalisé

à partir de cette suspension, le blanc est obtenu en réalisant le même protocole avec du lait non inoculé.

3.2. Mesure des quantités de peptides produits et de leur répartition en poids moléculaire

Dans cette étude, les peptides produits par les souches bactériennes au cours de la fermentation sont analysés par deux méthodes. Les concentrations en peptides produits après fermentation sont évaluées par dosage au réactif de Folin-Ciocalteu, ces peptides sont également analysés en fonction de leur répartition en poids moléculaire apparent par chromatographie d'exclusion stérique.

3.2.1. Extraction et purification des peptides produits

A partir des cultures en lait écrémé, un prélèvement de 4 mL est réalisé puis mélangé à un volume de 400 μ L d'une solution d'acide trichloroacétique (TCA) à une concentration de 10 % (m/v) pour atteindre une concentration finale en TCA de 1 %. Après une centrifugation à $13.000 \times g$ pendant 10 min, le surnageant contenant les peptides est récupéré.

Les peptides sont ensuite purifiés à partir du surnageant afin d'éliminer le TCA, les sucres, et les sels. La purification est réalisée par une extraction en phase solide (Solid Phase Extraction, SPE). Des micro-colonnes Bond Elut C_{18} (1000 mg) (Agilent Technologies, Santa Clara, Etats-Unis) sont utilisées pour réaliser la séparation des peptides à partir d'une phase solide de silice greffée avec des groupements C_{18} permettant la rétention de composés hydrophobes.

Les colonnes sont dans un premier temps conditionnées par un minimum de 10 volumes de colonne (environ 10 mL) d'une solution d'acétonitrile (ACN) 100 % supplémenté de 0,1 % d'acide trifluoroacétique (TFA) (v/v). Après équilibration de la colonne par 10 volumes d'une solution d' H_2O contenant 0,1 % de TFA (v/v), un volume de 4 mL de surnageant contenant les peptides extraits est alors chargé sur la colonne. L'élution du matériel non retenu par la colonne est réalisé par lavage de 10 volumes d' H_2O supplémenté de 0,1 % de TFA. Les peptides retenus sont finalement élués à l'aide d'un volume de 2 mL d'une solution d'ACN à 80 % (v/v), 20 % d' H_2O (v/v) et contenant 0,1 % de TFA. Les échantillons sont ensuite stockés à $-20^{\circ}C$ jusqu'à analyse.

3.2.2. Dosage au réactif de Folin-Ciocalteu

Les peptides extraits à partir des différentes cultures, ont été quantifiés par un dosage au réactif de Folin-Ciocalteu (Lowry *et al.*, 1951; McSweeney & Fox, 1997). Pour le dosage, la réaction est réalisée dans un volume final de 800 μL comprenant 200 μL de peptides extraits, 500 μL d'une solution de carbonate de sodium (NaHCO_3) à 500 mM et 100 μL de réactif de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, St Louis, Etats-Unis). La réaction est incubée à 37°C à l'obscurité pendant 30 min, puis la DO à 750 nm du mélange est mesurée par un spectrophotomètre Prim (Secomam, Groupe Aqualabo, Champigny, France) afin d'évaluer la quantité de peptides. L'échantillon « blanc » est constitué de la solution servant à éluer les peptides des colonnes SPE (80 % ACN, 20 % H_2O , 0,1 % TFA). La concentration dans les échantillons est déterminée par une gamme étalon d'une solution commerciale de peptides (peptide digest assay standard, ThermoFisher Scientific, Waltham, Etats-Unis).

3.2.3. Analyse par chromatographie d'exclusion stérique

Dans cette étude, la SEC permet d'analyser la répartition en poids moléculaire apparent des peptides extraits après fermentation. La colonne utilisée pour la séparation des peptides est une Superdex Peptide 10/300 GL (10 $\times$ 300-310 mm, 13 μm , GE Healthcare, Little Chalfont, Royaume-Uni) branchée sur un système de purification AKTA Protein (GE Healthcare, Little Chalfont, Royaume-Uni). Un volume de 25 μL d'échantillon est élué en condition isocratique dans un solvant composé de 30 % d'ACN (v/v), 70 % d' H_2O (v/v) et 0,1 % de TFA (v/v), à un débit de 0,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ pendant 60 min. Un détecteur UV à 214 nm permet la détection des liaisons peptidiques.

La quantité de peptides dans les échantillons est analysée par intégration des profils obtenus par SEC. Deux gammes de poids moléculaires ont été choisies pour les intégrations, la première concerne les peptides de poids moléculaire apparent supérieurs à 1.700 Da (appelée PHPM, peptides de haut poids moléculaire) et la deuxième les peptides de poids moléculaire apparent inférieurs à 1.700 Da (appelé PBPM, peptides de bas poids moléculaire). La quantité de peptides appartenant à chaque classe de taille est exprimée soit en pourcentage de l'aire totale du chromatogramme (% PHPM et % PBPM), soit en pourcentage de l'aire du chromatogramme obtenu pour la condition contrôle lait non inoculé (% PHPM/lait et % PBPM/lait).

3.3. Analyse du comportement des souches en lait écrémé

Dans cette partie, une analyse en composantes principales (ACP) est réalisée à partir des moyennes obtenues pour les 8 variables quantitatives évaluées suite aux cultures en lait écrémé, les résultats obtenus sur les géloses au lait ont été ajoutés au jeu de données. L'ACP est réalisée sous le logiciel R (R core team, 2016, Vienne, Autriche), sur le package R Commander (Fox, 2005) et son plug-in FactorMineR (Lê *et al.*, 2008).

4. Etude des spécificités protéolytiques des souches

L'objectif de cette partie est d'identifier les protéases pariétales (CEP) exprimées par les différentes souches mais également d'apprécier leurs spécificités vis-à-vis des protéines du lait notamment des caséines.

4.1. Détection des gènes codant les protéases pariétales par PCR

L'identification des protéases pariétales parmi les souches sélectionnées a été réalisée par détection des gènes codant ces enzymes par PCR. Les cellules bactériennes ont été récupérées des cultures en lait écrémé comme décrit précédemment au **paragraphe V.3.1.**, l'ADN bactérien a ensuite été isolé par utilisation d'un kit wizard genomic DNA purification (Promega, Madison, Etats-Unis). La souche CNRZ32 CIRM-BIA 103 de *L. helveticus* (fournie par le Centre International de Ressources Microbiennes - Bactéries d'Intérêts Alimentaires, CIRM-BIA, INRA, Rennes, France) a été utilisée comme contrôle pour les gènes de *L. helveticus*.

Chaque souche est testée pour 5 couples d'amorces correspondant à 5 gènes différents à savoir, *prtB*, *prth1*, *prth2*, *prth3* et *prth4* (**Tableau 5**). Les amorces décrites par Hou *et al.*, (2015) ont été utilisés pour la détection de *prtB* chez *L. delbrueckii*. Concernant les souches de *L. helveticus*, les amorces décrites par Genay *et al.*, (2009) ont été utilisées pour la détection des gènes *prth1* et *prth2* et enfin celles décrites par Broadbent *et al.*, (2011) pour la détection de *prth3* et *prth4*.

Tableau 5 : Amorces utilisées pour la détection des gènes codant les CEP.

Gene	Amorces (5'-3')	Taille de l'amplicon (pb)	T _m (°C)	Référence
<i>prtH1</i>	Forward : GGTACTTCAATGGCTTCTCC Reverse : GATGCGCCATCAATCTTCTT	470	58	Genay <i>et al.</i> , (2009)
<i>prtH2</i>	Forward : GTTGGTGCCGCAACTAAATC Reverse : TAGCATTTTGGTCAAAGACA	430	58	Genay <i>et al.</i> , (2009)
<i>prtH3</i>	Forward : GATGATCAAGCAGATGTAAAACCGGCAGAAG Reverse : ATTTACTGAAGAATTAGTCAAATGACCTGTTGTCGG	357	54	Broadbent <i>et al.</i> , (2011)
<i>prtH4</i>	Forward : CTGAAGCAGCAACTAATGATCCTGG Reverse : TGGATTAGGATCCGTTCTGGTTGTCAG	3386	54	Broadbent <i>et al.</i> , (2011)
<i>prtB</i>	Forward : GTGGCAATTCAAATCTAATC Reverse : GCTGTAATCATCACCCCTCAT	107	50	Hou <i>et al.</i> , (2015)

Les réactions PCR sont conduites dans un volume final de 25 µL comprenant 12,5 µL de PCR Master Mix (2×) (ThermoFisher Scientific, Waltham, Etats-Unis), 2 µL de chaque amorce (12,5 µM), 2 µL d'ADN bactérien extrait (environ 200 ng.µL⁻¹) et 6,5 µL d'H₂O. Les cycles PCR sont réalisés dans un thermocycler labcycler (SensoQuest, Göttingen, Allemagne). Après une première dénaturation à 95°C pendant 5 min, 30 cycles de PCR sont répétés successivement, un cycle se compose d'une dénaturation à 95°C pendant 30 sec, d'une hybridation pendant 1 min à la température d'hybridation requise pour chaque amorce (**Tableau 5**) et d'une élongation à 72°C pendant 30 sec (4 min pour le gène *prtH4*). Une dernière élongation à 72°C pendant 10 min a lieu après les 30 cycles PCR.

Les produits PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % (m/v) préparé dans un tampon TBE. La révélation des fragments d'ADN est réalisée par l'ajout dans le gel de 0,008 % (v/v) de GelRed® (10.000×) (Biotium, Fremont, Etats-Unis). Dix µL de produits PCR sont mélangés avec 4 µL de tampon de charge (6×) (ThermoFisher Scientific, Waltham, Etats-Unis) avant d'être déposé sur le gel d'agarose. Le mélange O'GeneRuler DNA Ladder Mix (ThermoFisher Scientific, Waltham, Etats-Unis) est utilisé comme marqueur de taille. La migration a lieu pendant 45 min à un voltage constant de 100 V. Les produits d'amplification sont visualisés au Gel Doc™ (Bio-Rad, Hercules, Etats-Unis).

4.2. Identification des peptides produits par spectrométrie de masse

Les peptides purifiés par SPE, à partir des surnageants de culture, ont été séchés par évaporation centrifuge (miVac, Gene Vac, Ipswich, Royaume-Uni) pendant 2 h à 40°C, resuspendus dans 100 μ L d'H₂O contenant 0,1 % de TFA (v/v) et centrifugés pendant 10 min à 10.000 $\times$ g.

Dix μ L d'échantillons dessalés sont séparés par chromatographie liquide haute performance en phase inverse (reverse phase-high performance liquid chromatography, RP-HPLC) sur une colonne C₁₈-Kinetex (150 $\times$ 4,6 mm, 2,6 μ m, 100 Å, Phenomenex, Torrance, Etats-Unis), branchée sur un système Acquity UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography, Waters, Manchester, Royaume-Uni). Le gradient d'ACN suivant a été utilisé : 5 à 15 % d'ACN/0,1 % TFA (v/v) pendant 30 min, puis 15 à 30 % d'ACN/0,1 % TFA (v/v) pendant 60 min, 30 à 50 % d'ACN/0,1 % TFA (v/v) pendant 10 min et enfin de 50 à 95 % d'ACN/0,1 % TFA pendant 10 min à un débit de 500 μ L.min⁻¹ et à 30°C.

Les peptides chromatographiés sont directement ionisés par electrospray puis tirés grâce à un analyseur de type Quadripôle-Temps de vol (Quadrupole-Time of flight, Q-TOF) sur une spectrométrie de masse Synapt-G2-Si (Waters, Manchester, Royaume-Uni) en mode sensibilité positif. Un voltage de 3 kV et une température de désolvation de 300°C ont été utilisés pour ioniser les molécules. Les mesures MS sont réalisés dans la gamme de masse des rapports masse sur charge (m/z) allant de 50 à 3200. Les mesures MS/MS sont réalisées en analyse donnée dépendante (data dependant analysis, DDA) dans la gamme de mesure des m/z 100 à 2000. Un maximum de 15 ions précurseurs avec un seuil d'intensité de 10.000 sont sélectionnés pour être fragmentés par dissociation induite par collision (collision induced dissociation, CID) à un voltage de 8 à 9 V pour les composés de faibles masses et un voltage de 40 à 90 V pour les composés de masses élevées. La leucine enképhaline (M/H⁺ de 556,632 Da) est injectée dans le système toutes les 2 min pendant 0,5 sec afin de suivre et corriger les erreurs de mesure du spectromètre de masse pendant toute la durée des analyses. Les réglages, calibrations et l'enregistrement des données sont pilotés par le logiciel propriétaire MassLynx (version 4.1.) (Waters, Manchester, Royaume-Uni).

La recherche en banque de données est réalisée via le logiciel Peaks Studio (version 7.0.) (Bioinformatics Solutions, Waterloo, Canada) en utilisant la base de données UniProt (mis à jour le 15 Mai 2017) restreinte au protéome complet de l'espèce *Bos taurus*. Les seuils de tolérance des masses des ions précurseurs et fragments sont définis respectivement à 35 ppm et 0,2 Da et la recherche d'identité en banque de données est effectuée sans notifier le choix d'une

enzyme protéolytique. Les séquences peptidiques identifiées par le logiciel sont filtrées selon un taux de faux positif (False Discovery Rate, FDR) strictement inférieur à 1 %.

4.3. Etablissement et analyse des cartographies peptidiques

Dans cette partie, seuls les peptides identifiés comme provenant de la caséine β , sont utilisés pour les cartographies. L'objectif de la cartographie peptidique est de pouvoir visualiser de manière plus adaptée l'hydrolyse des protéines laitières pour les différentes fermentations. Ces cartographies sont appelées cartes de chaleurs, le principe est de calculer la fréquence d'apparition de chaque acide aminé d'une protéine dans les séquences peptides identifiées. La fréquence d'apparition est calculée *in silico* (Lacroix & Li-Chan, 2012) en utilisant un outil conçu sur le logiciel Microsoft Excel (version 2013) (Microsoft Office) par la relation :

$$A = \frac{a}{N}$$

Avec A : la fréquence d'apparition de l'acide aminé X, a : l'occurrence de l'acide aminé X dans les séquences peptidiques et N : le nombre de séquences peptidiques. Selon la valeur obtenue pour la fréquence d'apparition, une couleur est associée à chaque acide aminé allant de blanc (aucune fréquence d'apparition) à rouge (forte fréquence d'apparition). Le résultat, ainsi appelé carte de chaleur est une représentation visuelle du profil d'hydrolyse de la caséine β par les différentes souches.

Les valeurs de fréquence d'apparition de chaque acide aminé de la caséine β dans les séquences peptidiques identifiées ont servi de matrice pour une ACP réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites dans le **paragraphe V.3.3.**

VI. Production des hydrolysats peptidiques par fermentation

Cette partie concerne la réalisation et l'étude de la fermentation du lait en bioréacteur par les souches d'intérêts pour la production d'hydrolysats peptidiques.

1. Fermentation en bioréacteur

Les souches sélectionnées ont été cultivées en bioréacteur de 500 mL (MiniBio 500, my-Control, Applikon Biotechnology, Delft, Pays-Bas). Le milieu est constitué de lait écrémé (10 g.L⁻¹) supplémenté d'extrait de levure (1 g.L⁻¹) (Sigma-Aldrich, St Louis, Etats-Unis) autoclavé 30 min à 110°C. Les souches sont inoculées à une DO à 600 nm égale à 0,3. La fermentation est conduite pendant 72 h à une température constante de 40 °C avec une agitation de 300 rpm dans un volume final de 330 mL. La condition anaérobie est contrôlée par l'injection de N₂ au sein du bioréacteur à un débit de 20 mL.min⁻¹. Tout au long de l'expérience, le pH est maintenu à 6 grâce à des solutions d'H₃PO₄ (1 M) et de NaOH (3 M), l'approvisionnement est réalisé au moyen de deux pompes péristaltiques localisées sur l'unité de contrôle du bioréacteur (**Figure 25**).

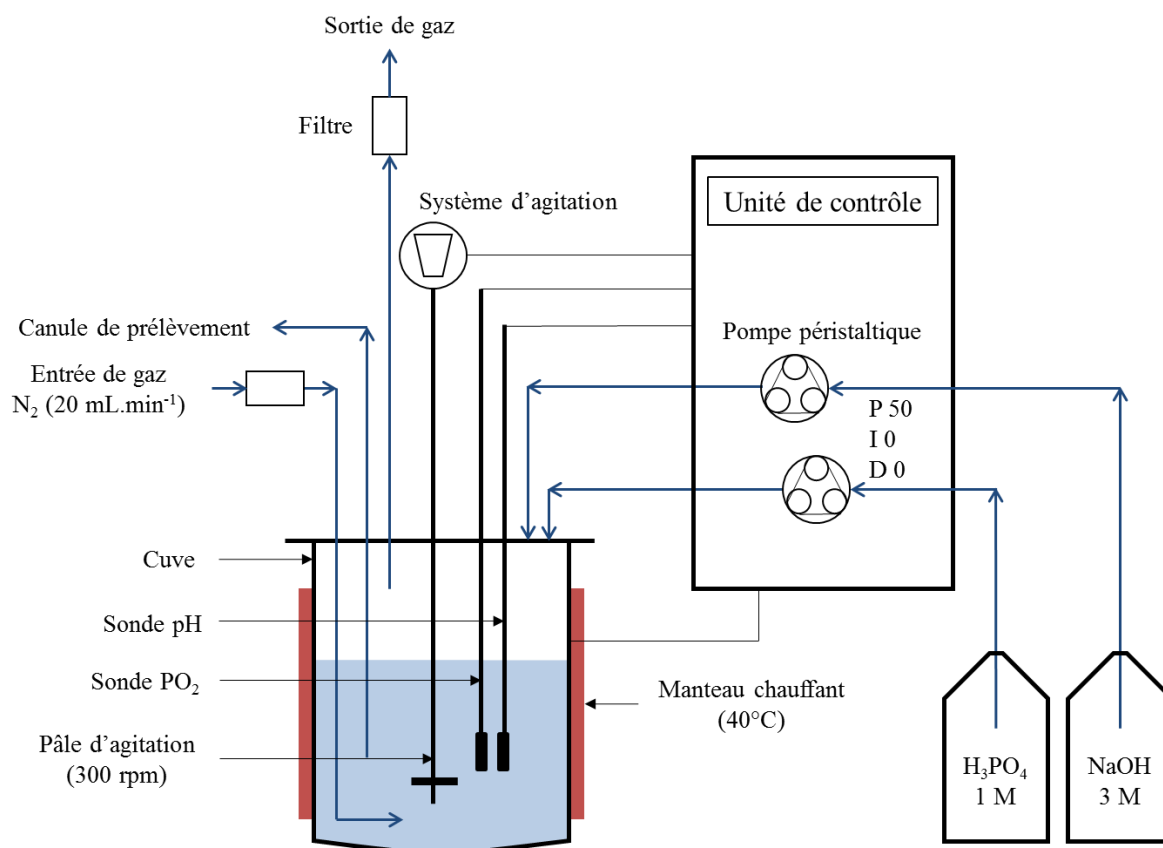


Figure 25 : Représentation schématique du système de fermentation en bioréacteur

Des prélèvements d'environ 5 mL sont réalisés en condition d'asepsie à 0, 2, 17, 24, 41, 48, 65 et 72 h de fermentation pour analyse de la croissance des souches bactériennes ainsi que de l'évolution de la concentration en peptides. Cette dernière est évaluée par un dosage au réactif de Folin-Ciocalteu (décrit dans le **paragraphe V.3.2.2.**) après une précipitation au TCA. Un volume de 1 mL de fermentât est dilué au 1/3 dans une solution d'EDTA 2 % (m/v) à pH 12 puis centrifugé à $13.000 \times g$ pendant 10 min et 25 μL de surnageant sont alors analysés par SEC (décrite dans le **paragraphe V.3.2.3.**). Le culot bactérien est lavé puis resuspendu dans 1 mL de tampon PBS pour mesure de la DO à 600 nm afin d'évaluer la croissance bactérienne.

Après 72 h de fermentation, l'intégralité du fermentât est récupérée puis centrifugée à $13.000 \times g$ pendant 10 min, le surnageant est ensuite stocké à -20°C jusqu'à analyse. La concentration en matière sèche dans les fermentâts est mesurée au dessiccateur (XM60, Precisa, Poissy, France) et est égale à 100 g.L^{-1} . Afin de pouvoir confirmer l'impact de la fermentation sur les hydrolysats peptidiques finaux, un produit dit contrôle a été réalisé (FCtl). Il s'agit du milieu de fermentation incubé dans les mêmes conditions mais non inoculé. Après 72 h d'incubation, ce fermentât a été centrifugé et stocké comme pour les autres fermentations.

2. Traitements et analyses des fermentâts produits

2.1. Séparation des peptides par ultrafiltration

Afin d'isoler les peptides produits au cours de la fermentation, une partie du fermentât brut (F Brut) a été fractionné au moyen d'une membrane d'ultrafiltration (**Figure 26**). La membrane est une cassette Hydrosart® (Sartocon® Slice Hydrosart® Cassette, Sartorius, Göttingen, Allemagne) de 0,1 m² avec un seuil de coupure de 10 kDa montée sur un système Sartocon® Slice 200 Holder (Sartorius, Göttingen, Allemagne). L'alimentation du fermentât est réalisée par une pompe péristaltique et la pression transmembranaire est maintenue à environ 0,5 bar pendant la filtration. Ainsi, le perméât d'ultrafiltration (UFP) contenant les molécules inférieures à 10 kDa est séparé du rétentât (UFR). Les deux sous-fractions sont ensuite conservées à -20°C jusqu'à analyse.

Les perméâts d'ultrafiltration ont été séchés jusqu'à 10 % du volume initial par évaporation centrifuge (miVac, Gene Vac, Ipswich, Royaume-Uni) pendant 15 h à 40°C. La concentration en matière sèche dans les produits est ensuite mesurée au dessiccateur (XM60, Precisa, Poissy, France).

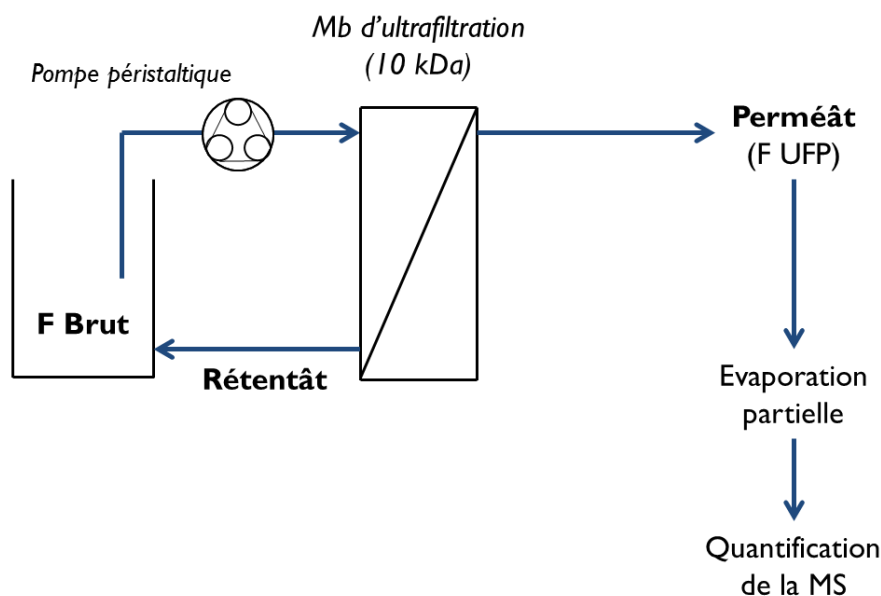


Figure 26 : Représentation schématique du traitement d'ultrafiltration réalisé sur les fermentâts bruts.

2.2. Simulation de la digestion gastro-intestinale

L'objectif de cette partie est de simuler *in vitro* l'impact d'une digestion gastro-intestinale sur les hydrolysats peptidiques produits par fermentation. Le protocole utilisé est celui mis au point par Caron *et al.*, (2016) en débutant directement par la phase gastrique. La composition des différents fluides est indiquée dans le **Tableau 6**. Les sels biliaires ne sont pas utilisés dans ce protocole.

Tableau 6 : Composition chimique des fluides simulés de la digestion GI *in vitro* statique.

	Fluide gastrique	Fluide duodénal	Fluide biliaire
Composition chimique	KCl (11 mM)	KCl (7,6 mM)	KCl (5 mM)
	NaH ₂ PO ₄ (2,2 mM)	KH ₂ PO ₄ (0,6 mM)	NaCl (90 mM)
	NH ₄ Cl (5,7 mM)	NaCl (120 mM)	NaHCO ₃ (69 mM)
	NaCl (47 mM)	NaHCO ₃ (40 mM)	HCl (1,5 mM)
	HCl (65 mM)	HCl (1,8 mM)	CO(NH ₂) ₂ (4 mM)
	CaCl ₂ (2,7 mM)	MgCl ₂ (0,5 mM)	
	CO(NH ₂) ₂ (1,4 mM)	CO(NH ₂) ₂ (1,7 mM)	
Protéases	Pepsine 1/40 (m/m)	Pancréatine 1/50 (m/m)	
pH	1,3 ± 0,2	8,1 ± 0,2	8,2 ± 0,2

La réaction est menée dans un réacteur de 200 mL à une température de 37°C avec une agitation magnétique constante. Une suspension de 20 mL contenant 2 g de matière sèche (soit 100 g.L⁻¹) de fermentât brut (F Brut) ou de perméat d'ultrafiltration (F UFP) est préparée dans l'H₂O. La phase gastrique est simulée par l'ajout de 24 mL de fluide gastrique et de 37,5 mg de pepsine porcine (ratio E : S 1/40). Le pH est maintenu entre 2,5 et 3 tout au long de la phase gastrique. Des prélèvements de 4 mL sont réalisés toutes les 30 min, après 2 h de phase gastrique, un dernier prélèvement (G2) est réalisé puis chauffé à 95°C pendant 10 min afin de stopper l'activité enzymatique. La phase intestinale est simulée par l'ajout de 12 mL de fluide biliaire, 24 mL de fluide intestinal et 4 mL de NaHCO₃ (1 M) et de 16,67 mg de pancréatine porcine (ratio E : S 1/50). Le pH est maintenu entre 7 et 7,5 pendant 2 h. Des prélèvements de 4 mL sont réalisés toutes les 30 min, et le dernier (I2) est inactivé thermiquement. Le volume réactionnel restant en fin de digestion est inactivé de la même façon puis stocké à -20°C jusqu'à

analyse. Chaque fermentât ou produit est digéré en triplicatas qui sont par la suite analysés de façon indépendante.

Les concentrations en matière sèche sont de 100 g.L⁻¹ dans le produit brut (F Brut ou F UFP), de 45,45 g.L⁻¹ en fin de phase gastrique (G2) et de 18,64 g.L⁻¹ en fin de phase intestinale (I2).

2.3. Analyse de l'impact de la digestion gastro-intestinale sur les fermentâts

L'impact de la digestion gastro-intestinale sur les hydrolysats peptidiques est évalué par différentes techniques précédemment utilisée dans cette étude. Pour les analyses, les différents échantillons sont dilués dans l'H₂O à une concentration de 15 g.L⁻¹ de matière sèche.

La quantité de peptides dans le produit brut et le produit digéré (I2) est évaluée par un dosage au réactif de Folin-Ciocalteu (décrit dans le **paragraphe V.3.2.2.**) après une précipitation au TCA. De plus, 25 µL de produit sont analysés par SEC (décrite dans le **paragraphe V.3.2.3.**).

Les peptides contenus dans les échantillons F Brut et I2 sont également extraits par SPE (décrite dans le **paragraphe V.3.2.1.**) puis analysés par spectrométrie de masse (décrite dans le **paragraphe V.4.2.**). Les cartes peptidiques 2D générées à partir des différents hydrolysats ont été comparées sous le logiciel Progenesis QI for proteomics (version 4.0.6403.35451) (Nonlinear Dynamics, Manchester, Royaume-Uni). Suite à cette comparaison, une ACP est réalisée afin de représenter les différences entre les échantillons. La recherche en banque de données est réalisée via le logiciel Peaks Studio (décrit dans le **paragraphe V.4.2.**).

VII. Etude des activités biologiques des hydrolysats

Dans cette partie, les hydrolysats peptidiques digérés ont été testés pour plusieurs activités biologiques à savoir, l'inhibition de la DPP-IV et de l'ACE, la stimulation de la sécrétion du GLP-1 et enfin la capacité à moduler l'absorption du calcium. Par ailleurs, la toxicité des hydrolysats a été évaluée. Pour les analyses, les différents échantillons sont dilués dans l'H₂O à une concentration de 15 g.L⁻¹ de matière sèche.

1. Test de cytotoxicité

Le but de cette expérience est de tester l'éventuelle toxicité des hydrolysats digérés envers les cellules intestinales. La viabilité cellulaire est ici mesurée par utilisation du réactif CCK-8 (Cell Counting Kit-8). Les cellules Caco-2 sontensemencées en plaque 96 puits à une densité de 8.000 cellules par puits dans un volume de 200 µL de milieu DMEM complet, et cultivées pendant 7 jours à 37°C, 5 % de CO₂. Les échantillons issus de la digestion des fermentâts brut et des perméâts d'ultrafiltration (F Brut I2 et F UFP I2), sont dilués dans du milieu DMEM complet à une concentration de 5 et 10 g.L⁻¹. Un tampon PBS également dilué dans du milieu DMEM (même facteur de dilution que les échantillons) est utilisé en tant que contrôle.

Un volume de 150 µL d'échantillon est déposé dans chaque puit, suivi d'une incubation pendant 7 ou 24 h à 37°C, 5 % de CO₂. Après incubation, les cellules Caco-2 sont lavées deux fois par du tampon PBS puis un volume de 150 µL de milieu DMEM complet supplémenté avec 5 % (v/v) de réactif CCK-8 (Sigma-Aldrich, St Louis, Etats-Unis) est ajouté dans chaque puit. La plaque est ensuite incubée pendant 2 h à 37°C, 5 % de CO₂ à l'obscurité, puis lue à 450 nm au spectrofluorimètre Xenius XC (Safas Monaco, Monaco, France). La viabilité cellulaire est calculée par rapport à l'absorbance obtenue pour les puits contrôle (correspondant à 100 % de cellules viables).

2. Inhibition de la dipeptidyl peptidase IV

L'inhibition de la DPP-IV par les hydrolysats produits a été évaluée selon deux méthodes, un test biochimique et un test *in situ* sur cellules Caco-2.

2.1. Test biochimique

Ce test consiste à incuber la DPP-IV purifiée et les échantillons à tester en présence d'un substrat enzymatique dont l'hydrolyse pourra être suivie par spectrophotométrie. Le substrat

utilisé dans cette expérience est le Gly-Pro-p-nitroaniline (Gly-Pro-pNA) dont l'hydrolyse par la DPP-IV génère le dipeptide Gly-Pro et le groupement chromophore p-NA détecté à 405 nm.

Les échantillons, l'enzyme et le substrat sont préparés et dilués dans un tampon Tris-HCl (100 mM) à pH 8 aux concentrations désirées. La réaction d'hydrolyse du substrat de la DPP-IV est conduite dans un volume de 175 µL en plaque 96 puits. Chaque puit contient 75 µL de tampon Tris-HCl, 25 µL de DPP-IV porcine (0,018 U.mL⁻¹) (Sigma-Aldrich, St Louis, Etats-Unis), 50 µL de substrat Gly-Pro-pNA (1 mM) (Sigma-Aldrich, St Louis, Etats-Unis) et 25 µL d'échantillon. Un témoin négatif ne contenant pas d'échantillon (remplacé par du tampon Tris-HCl) est réalisé, ainsi qu'un témoin d'autolyse du substrat (enzyme remplacée par du tampon Tris-HCl). La plaque est ensuite incubée pendant 1 h à 37°C sous agitation modérée, et l'absorbance à 405 nm est lue toutes les 2 min par un spectrophotomètre ELx808 (BioTek Instruments Inc., Vermont, Etats-Unis).

Le pourcentage d'inhibition de la DPP-IV par les échantillons testés est calculé en fonction de l'absorbance obtenue pour le témoin négatif. En effet, en absence d'inhibiteur (témoin négatif), le signal mesuré correspond à 100 % d'activité de la DPP-IV soit 0 % d'inhibition. En présence d'un échantillon inhibiteur, le signal mesuré est rapporté à celui du témoin négatif et converti en pourcentage d'inhibition par la relation :

$$\% \text{ Inhibition} = \left(1 - \frac{\text{Absorbance échantillon}}{\text{Absorbance témoin négatif}} \right) \times 100$$

L'activité des hydrolysats est exprimée selon la concentration de l'échantillon inhibant la moitié de l'activité enzymatique (IC₅₀) en mg.mL⁻¹ de matière sèche. Pour calculer cette IC₅₀, les pourcentages d'inhibition sont reportés en fonction du logarithme népérien de la concentration finale de l'échantillon testé. Une régression linéaire permet d'obtenir la relation :

$$\% \text{ Inhibition} = a \times \ln(\text{échantillon}) + b$$

Avec a : la pente et b : l'ordonnée à l'origine.

Les valeurs d'IC₅₀ sont ensuite déterminées par la relation :

$$IC_{50} = \exp \frac{50 - b}{a}$$

2.2. Test sur modèle Caco-2

Ce test, mis au point par Caron *et al.*, (2016), utilise les cellules Caco-2 comme source de la DPP-IV exprimée au niveau de la membrane plasmique des cellules intestinales. Pour cette

expérience, le substrat fluorescent Gly-Pro-7-amido-4-méthylcoumarine (Gly-Pro-AMC) est utilisé.

Les cellules Caco-2 sontensemencées en plaque 96 puits à une densité de 8.000 cellules par puits dans un volume final de 200 μL de milieu DMEM complet et cultivées pendant 7 jours à 37°C, 5 % de CO_2 . Les cellules sont lavées deux fois avec du tampon PBS avant l'expérience. Les échantillons, l'enzyme et le substrat sont cette fois préparés dans un tampon PBS aux concentrations désirées. Un volume de 75 μL de tampon PBS est ajouté dans chaque puit suivi par l'ajout de 25 μL d'échantillon à tester ou de tampon PBS pour le témoin négatif d'inhibition. L'ajout de 50 μL de substrat Gly-Pro-AMC (1 mM) est réalisé dans tous les puits avant incubation de la plaque pendant 1 h à 37°C. La fluorescence est enregistrée toutes les 2 min avec une longueur d'onde d'excitation et d'émission de 360 et 438 nm respectivement par un spectrofluorimètre Xenius XC (Safas Monaco, Monaco, France) équipé d'un bain-marie à 37°C. Les pourcentages d'inhibition sont calculés comme décrit précédemment (**paragraphe VII.2.1.**).

3. Inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine

L'objectif est d'étudier le potentiel inhibiteur des hydrolysats produits envers l'ACE. Le test utilisé est un test biochimique à l'instar de celui utilisé pour mesurer l'inhibition de la DPP-IV. Il a été mis au point par Sentandreu & Toldrá, (2006) et repose sur l'utilisation d'un substrat fluorescent le o-aminobenzoyl-Gly-p-nitro-L-Phe-Pro (Abz-Gly-Phe(NO_2)-Pro).

Les échantillons, l'enzyme et le substrat sont préparés et dilués dans un tampon Tris-HCl (150 mM) à pH 8,3 aux concentrations désirées. La réaction d'hydrolyse est conduite en plaque 96 puits dans un volume final de 300 μL comprenant 50 μL d'échantillon ou de tampon Tris-HCl (pour le témoin négatif d'inhibition), 50 μL d'une solution d'ACE (0,05 U.mL^{-1}) (Sigma-Aldrich, St Louis, Etats-Unis) et 200 μL de substrat Abz-Gly-Phe(NO_2)-Pro (0,45 mM) (Bachem, Bubendorf, Suisse). Un témoin ne contenant pas d'enzyme (remplacée par du tampon Tris-HCl) est également réalisé. La plaque est ensuite incubée à 37°C pendant 1 h, une mesure de la fluorescence a lieu toutes les 2 min d'incubation avec des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 365 et 415 nm respectivement par un spectrofluorimètre Xenius XC (Safas Monaco, Monaco, France) équipé d'un bain-marie à 37°C. Les pourcentages d'inhibition et les IC_{50} des différents échantillons testés sont calculés comme décrit précédemment (**paragraphe VII.2.1.**).

4. Stimulation de la sécrétion du glucagon-like peptide-1

Le potentiel stimulateur des hydrolysats pour la sécrétion du GLP-1 est évalué par dosage de cette hormone après contact des fermentâts digérés avec les cellules entéro-endocrines murines STC-1 (Rindi *et al.*, 1990). Au cours de ce projet, les cellules STC-1 sont cultivées de la même façon que pour les cellules Caco-2 et HT-29 MTX sauf que le passage en trypsine a lieu tous les deux jours et une flasque T75 est constamment maintenue.

Pour l'expérience, les cellules STC-1 sontensemencées en plaque 24 puits à une densité de 40.000 cellules par puits dans un volume final de 500 μ L de milieu DMEM complet et cultivées pendant environ 2 jours à 37°C, 5% de CO₂ jusqu'à la confluence. Les échantillons sont dilués à des concentrations de 5 et 10 g.L⁻¹ de matière sèche dans un tampon d'incubation composé de KCl (4,5 mM), de CaCl₂ (1,2 mM), de NaCl (140 mM) et d'HEPES-Tris (20 mM) à pH 7,4.

Pour le contact, les cellules sont rincées deux fois avec le tampon d'incubation puis un volume de 300 μ L de l'échantillon à tester ou de tampon d'incubation (pour le contrôle) est ajouté dans les puits. Après 2 h d'incubation à 37°C, 5 % de CO₂, les surnageants sont récupérés et centrifugés pendant 5 min à 5.000 $\times$ g puis congelés à -20°C jusqu'à analyse.

La quantification du GLP-1 est réalisée par un dosage radio-immunologique réalisé via le kit GLP-1A-35HK (EMD Millipore Corporation, Darmstadt, Allemagne).

5. Modulation de l'absorption du calcium

5.1. Etude de l'incorporation du calcium

Afin d'étudier la capacité des hydrolysats peptidiques à moduler l'incorporation du calcium, l'expérience décrite dans le **paragraphe IV.3.** utilisant la sonde Green FluoForte® a été réalisée.

Pour l'expérience, les cellules Caco-2 sontensemencées en plaque 96 puits à une densité de 8.000 cellules par puits dans un volume final de 200 μ L de milieu DMEM complet et cultivées pendant environ 15 jours à 37°C, 5% de CO₂. Les fermentâts digérés sont dilués dans du milieu DMEM complet à une concentration finale en matière sèche de 10 g.L⁻¹. Pour le contact, les cellules sont rincées deux fois par du tampon PBS puis 150 μ L d'échantillon sont déposés dans chaque puit. Le tampon PBS dilué dans le milieu DMEM (même facteur de dilution que pour les échantillons) est utilisé en tant que contrôle. La plaque est ensuite incubée pendant 7 h à 37°C, 5 % de CO₂. Après contact, les cellules sont lavées deux fois par du tampon PBS et

l'analyse de l'incorporation du calcium par les cellules intestinales est conduite comme décrit précédemment (**paragraphe IV.3.**).

5.2. Modulation de l'expression du transporteur du calcium

L'objectif de cette partie est d'évaluer la capacité des hydrolysats peptidiques à moduler l'expression de transporteur actif du calcium. Une approche par RT-qPCR est conduite en utilisant les cellules Caco-2 comme modèle.

Les cellules Caco-2 sontensemencées en plaque 24 puits à une densité de 40.000 cellules par puits dans un volume final de 500 μ L de milieu DMEM complet et incubées pendant 15 jours à 37°C, 5 % de CO₂ avec un changement du milieu tous les deux jours après 7 jours de culture. Les fermentâts digérés sont dilués en milieu DMEM complet à une concentration de 10 g.L⁻¹ de matière sèche. Le tampon PBS dilué dans le milieu DMEM (même facteur de dilution que pour les échantillons) est utilisé en tant que contrôle.

Après incubation, les cellules sont lavées deux fois par du tampon PBS, puis un volume de 300 μ L de chaque échantillon est déposé dans les puits. La plaque est ensuite incubée pendant 7 h à 37°C, 5 % de CO₂. Après contact entre les cellules Caco-2 et les échantillons, les puits sont rincés deux fois avec du tampon PBS puis une extraction des ARN par le réactif TRIzol™ est réalisée (**paragraphe IV.4.**). La rétro-transcription des ARN ainsi que les réactions de qPCR sont réalisés dans les mêmes conditions que celles décrites dans le **paragraphe IV.4.**

Dans cette partie, le gène codant pour le transporteur du calcium (transient receptor potential selective for calcium) (*trpv6*) également appelé CaT1 (calcium transporter 1) est étudié. L'expression du gène est normalisée par rapport à celle du gène codant pour la peptidylprolyl isomerase A (*ppiA*) pris pour référence. Les couples d'amorces utilisés pour les gènes étudiés, ainsi que leurs températures d'hybridation, sont présentés dans le **Tableau 4.**

6. Prédiction des activités biologiques

A partir des séquences peptidiques identifiées par spectrométrie de masse dans les fermentats digérés ou non (**paragraphe VI.2.3.**), différentes prédictions d'activités biologiques des hydrolysats ont été réalisées.

Dans un premier temps, la base de données Milk bioactive peptide database (MBPDB) (Nielsen *et al.*, 2017) a été utilisée pour la recherche de peptides bioactifs déjà identifiés. L'interrogation de la banque est réalisée pour chaque échantillon avec un score d'identité des séquences de 100 %.

En parallèle, les activités biologiques des peptides identifiés ont été prédites en utilisant un modèle basé sur une relation quantitative structure à activité (QSAR). Cette partie a été réalisée en collaboration avec le Dr. Alice Nongonierma de l'Université de Limerick (Irlande), département des sciences biologiques. La capacité d'inhibition de l'ACE des différents peptides identifiés a été prédite par le modèle QSAR d'inhibition de l'ACE développé par Pripp *et al.*, (2004), ce modèle utilise les z-scores, définis par Hellberg *et al.*, (1987) comme descripteurs des acides aminés composant les peptides. De plus, l'activité d'inhibition de la DPP-IV a également été prédite en utilisant le modèle QSAR développé par Nongonierma & Fitzgerald, (2016) basé sur les v-scores (Lin *et al.*, 2008) comme descripteurs des acides aminés. A partir des deux modèles QSAR utilisés, des valeurs prédictives d'IC₅₀ sont obtenues pour chaque séquence peptidique, les répartitions de ces IC₅₀ sont ensuite comparées entre les différents hydrolysats.

VIII. Développement d'un procédé de production en continu

L'objectif de cette partie est le développement d'un procédé de production d'un hydrolysat d'intérêt de façon continue. Le produit de fermentation résultant est ensuite atomisé avant de tester l'activité biologique à savoir l'inhibition de l'ACE.

1. Procédés de fermentation en continus

La fermentation est conduite dans un bioréacteur de 5 L (Applikon Biotechnology, Delft, Pays-Bas) couplée à une membrane de microfiltration (Microfiltration Hollow Fiber Cartridge, polysulfone, 3.600 m², GE Healthcare, Little Chalfont, Royaume-Uni) avec un seuil de coupure à 0,2 µm. Les conditions de culture sont identiques à celles décrites dans le **paragraphe VI.1.**, le milieu est inoculé à une DO égale à 0,3 dans un volume final de 3,3 L. Une phase de culture de type batch est réalisée pendant les premières 24 h du procédé.

Pour le mode continu (**Figure 27**), le milieu de culture circule dans la membrane de microfiltration au moyen d'une pompe péristaltique à un débit de 1,1 L.min⁻¹, le rétentât de filtration est renvoyé au bioréacteur avec l'intégralité des cellules (mode recyclage total des cellules).

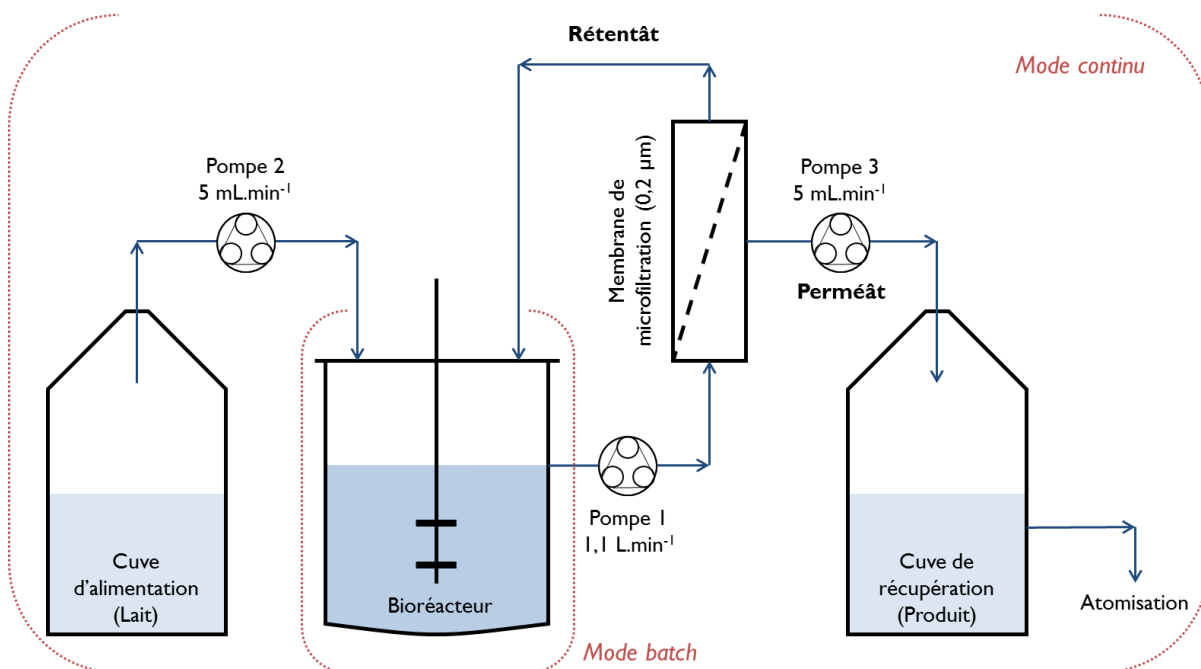


Figure 27 : Représentation schématique du procédé de fermentation en continu.

Une pompe péristaltique dite d'alimentation fonctionnant à un débit de $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, permet l'alimentation en milieu de culture stérile du bioréacteur. Dans ces conditions, le taux de dilution est donc de $0,1 \text{ h}^{-1}$. Le perméât de filtration est quant à lui, extrait de la membrane par une dernière pompe péristaltique avec un débit de $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, et récolté dans une cuve de récupération (ou cuve produit). La phase de culture continue est réalisée pendant 48 h, le temps total du procédé est donc de 72 h.

Les mêmes expériences de fermentation ont été conduites sans le système de microfiltration. Ces cultures sont réalisées en bioréacteur Minibio 500 (Applikon Biotechnology, Delft, Pays-Bas) contenant 300 mL de milieu. Lors de la phase continue, le bioréacteur est alimenté en milieu au même taux de dilution de $0,1 \text{ h}^{-1}$ ($0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) et le milieu de fermentation est soutiré du bioréacteur au même débit.

Différents prélèvements d'environ 5 mL sont réalisés dans les bioréacteurs en condition d'asepsie à 1, 4, 8, 24, 32, 48, 52, 57 et 72 h de culture, ainsi que dans la cuve produit à 32, 48, 52, 57 et 72 h de culture. Après la fermentation, l'intégralité du contenu de la cuve produit est conservée à 4°C . Les échantillons prélevés sont analysés pour évaluation de la croissance bactérienne et de la concentration en peptides (dosage au réactif de Folin-Ciocalteu et SEC) comme décrit dans le **paragraphe VI.1**. La concentration en matière sèche dans le produit de fermentation est mesurée au dessiccateur (XM60, Precisa, Poissy, France).

L'analyse des sucres et des acides organiques dans les échantillons a été réalisé par HPLC de type échangeuse d'ions. La colonne utilisée pour la séparation des hydrates de carbone est une Fast Fruit Juice ($50\text{\AA}$, $7 \mu\text{m}$, $7,8 \times 50 \text{ mm}$, Waters, Manchester, Royaume-Uni) branchée sur un système de purification SpectraSYSTEM (Thermo Electron Corporation, San Jose, Etats-Unis). Un volume de $20 \mu\text{L}$ de surnageant de fermentation ou de produit est élué en condition isocratique dans un solvant composé d'acide phosphorique à $0,05 \text{ M}$ à un débit de $0,8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ pendant 10 min à 55°C . Un réfractomètre (SpectraSYSTEM RI-150, Thermo Electron Corporation, San Jose, Etats-Unis) permet la détection des molécules éluées en sortie de colonne. Les teneurs en lactose et en acide lactique dans les échantillons sont déterminées par la réalisation de gammes étalon de ces composés.

2. Atomisation du produit de fermentation

Le produit résultant du procédé de fermentation est séché par atomisation. Afin de faciliter le processus, une poudre de maltodextrines (Glucidex IT 12, Roquette, Lestrem, France) est utilisée comme agent de charge. Les maltodextrines sont dissoutes dans le produit de fermentation à des concentrations de 0, 5, 10 ou 20 % (m/v) avant l'atomisation. Un volume de 200 mL de produit est atomisé (Mini atomizer B-290, Buchi, Rungis, France) par pulvérisation du produit à un débit d'environ 8 mL.min⁻¹. L'air entrant dans la tour d'atomisation est fixée à une température de 130°C et le produit séché sort entre 65 et 73°C. Le rendement d'atomisation est calculé par le ratio de la matière sèche récupérée dans le pot de collecte de l'atomiseur sur la matière sèche théorique de la solution de départ.

Après atomisation, le produit de fermentation est testé pour sa capacité d'inhibition de l'ACE comme décrit dans le **paragraphe VII.3.**

IX. Réplicats et analyses statistiques

Au minimum trois réplicats biologiques sont réalisés pour les expériences décrites dans ce chapitre, excepté pour les fermentations en bioréacteur qui sont conduites en duplicata.

Pour chaque fermentât produits, trois digestions gastro-intestinales différentes sont réalisées, les digestats résultants sont ensuite testés indépendamment pour les différents tests en duplicata au minimum.

La significativité des résultats est évaluée par une analyse de la variance (ANOVA) à un facteur suivi d'un test de Tukey pour la comparaison multiple des moyennes. Concernant l'expérience de transport du calcium au travers d'une membrane de cellules Caco-2, le test post-ANOVA est un test de Dunn aboutissant à une comparaison à la moyenne de la condition contrôle. La différence entre les moyennes est considérée comme significative pour une p value $< 0,05$. Les tests statistiques ont été conduits sous le logiciel R (R core team, 2016, Vienne, Autriche), sur le package R Commander (Fox, 2005).

Chapitre 3

Approche probiotiques

I. Introduction bibliographique

1. Microbiote intestinal et pathophysiologies liées au vieillissement

L'être humain abrite au sein de son tube digestif un écosystème complexe communément appelé microbiote intestinal. Cette communauté ne comptant pas moins de 10^{14} cellules, est composée des trois règnes du vivant à savoir les Archées, les Bactéries et les Eucaryotes. Le microbiote intestinal d'un individu est composé de plus d'une centaine d'espèces bactériennes différentes, les principaux *phyla* étant les Firmicutes, les Bacteroidetes et les Actinobactéries (Donaldson *et al.*, 2015; Scott *et al.*, 2013).

Dès sa naissance, l'homme est colonisé par ces organismes qui vont co-évoluer avec lui pour le reste de sa vie. Le microbiote intestinal joue un rôle primordial dans l'éducation du système immunitaire au cours des premières années de la vie ainsi que sur la digestion des aliments et l'apport énergétique, participant ainsi aux homéostasies immunitaire et intestinale. Pour exemple, la digestion des fibres par les organismes peuplant l'intestin conduit à la production d'acides gras à chaînes courtes (SCFAs), des molécules utilisées comme source d'énergie par les cellules intestinales, mais également impliquées dans l'homéostasie énergétique ou encore la régulation de la réponse immunitaire et inflammatoire (Flint *et al.*, 2012; Mohajeri *et al.*, 2018). Chaque individu possède un microbiote qui lui est propre, la composition varie selon différents facteurs comme la colonisation à la naissance, la génétique de l'hôte mais également des facteurs environnementaux tels que l'alimentation, la prise d'antibiotiques ou simplement le mode de vie (Kurilshikov *et al.*, 2017).

L'impact du microbiote intestinal sur la santé et la physiologie de son hôte est aujourd'hui largement reconnu, si bien qu'il est considéré comme un organe à part entière. Le microbiome, c'est-à-dire l'ensemble des gènes contenus au sein du microbiote intestinal est 150 fois supérieur aux gènes constituant le génome humain (Ehrlich, 2016). Depuis quelques années, plusieurs études ont montré l'impact du microbiote sur de nombreux processus physiologiques et fonctions métaboliques de l'organisme. Un microbiote sain et équilibré, en état d'eubiose, est impliqué dans le contrôle du métabolisme de l'hôte, la résistance aux infections et aux inflammations, la prévention de certains cancers et également la communication avec le système nerveux via l'axe intestin-cerveau. L'altération du microbiote par des facteurs environnementaux, est qualifiée, en opposition au terme eubiose, de dysbiose et peut constituer

un facteur de risque pour différentes pathologies comme le syndrome métabolique, le cancer, l'infection par des pathogènes, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICIs) ou des maladies cardiovasculaires (Flint *et al.*, 2012; Lin & Zhang, 2017). Concernant les pathologies osseuses, il est établi que le métabolisme osseux est impacté par la physiologie intestinale notamment via des mécanismes immunitaires. La connexion existante entre le microbiote et l'intestin de son hôte suggère un impact de cette communauté microbienne sur la physiologie osseuse. Certains auteurs ont même récemment reconnu l'existence d'un axe intestin-microbiote-os (Ramsey & Isales, 2017; Villa *et al.*, 2017). L'effet du microbiote intestinal sur le métabolisme osseux a fait l'objet de quelques études, des souris gnotobiotiques (dépourvues de microbiote) présentent une masse osseuse supérieure aux souris conventionnelles. Plus particulièrement, la formation osseuse n'est pas affectée, suggérant que la résorption osseuse est inhibée chez ces animaux. Les travaux ont montré que l'absence de microbiote intestinal était liée à des réponses immunitaires anormales elles-mêmes impliquées dans l'ostéoclastogénèse, ce qui souligne l'impact du microbiote sur le métabolisme osseux (Sjögren *et al.*, 2012). Des études *in vivo* ont montré qu'un traitement antibiotique entraînait une augmentation de la masse osseuse et que le traitement n'avait pas diminué la population du microbiote intestinal mais a plutôt modifié sa composition (Ohlsson & Sjögren, 2015).

L'installation du microbiote intestinal débute dès les premiers jours de la vie, une certaine stabilité de la composition du microbiote sera acquise à partir de 3 à 5 ans après la naissance. Le microbiote de l'hôte, une fois établi, restera relativement stable jusqu'à 65-70 ans, il subira néanmoins quelques changements temporaires en fonction des facteurs environnementaux pouvant conduire à une dysbiose (Vaiserman *et al.*, 2017). Chez les personnes âgées, des études ont montré que le microbiote tend à s'appauvrir dans sa biodiversité et présente plus de variations interindividuelles que chez les adultes. Un lien entre la composition du microbiote intestinal, l'alimentation et le mode de vie a également été mis en évidence (Rodríguez *et al.*, 2015). Ainsi, la diminution de la consommation de fibres entraînerait une baisse de l'abondance des organismes appartenant au genre *Clostridium*, des producteurs de SCFAs. Ces changements du microbiote liés à l'âge peuvent également impacter l'homéostasie immunitaire favorisant un profil pro-inflammatoire dans l'intestin. De plus, la consommation accrue de médicaments ou d'antibiotiques chez les personnes âgées ne joue pas en la faveur de la biodiversité du microbiote. Ces modifications liées au vieillissement constituent des facteurs de risques pour de nombreuses pathologies (Mello *et al.*, 2016). En considérant ces profonds changements, l'utilisation de probiotiques peut constituer une approche prometteuse et sûre afin de

rééquilibrer la flore microbienne et apporter un bénéfice santé sur l'hôte (Derrien & Van Hylckama Vlieg, 2015; Vaiserman *et al.*, 2017).

2. Les probiotiques, des organismes aux effets bénéfiques pour la santé

2.2. Généralités sur les probiotiques

2.2.1. Mise en évidence et définition des probiotiques

Au début du 20^{ème} siècle, Elie Metchnikoff (1845-1916), immunologiste d'origine Ukrainienne et décoré d'un prix Nobel de médecine en 1908 pour ses découvertes sur la phagocytose, fut le premier scientifique à introduire le concept des probiotiques. Il fit le lien entre, l'état de santé et la longévité élevée des paysans Bulgares, avec leur consommation de produits laitiers fermentés tels que les yaourts. Il établira plus tard comment les bactéries « saines », présentes dans le yaourt, impactaient positivement la digestion et le système immunitaire de l'hôte. En 1907, il publia ses observations dans son livre « The prolongation of life » (Anukam & Reid, 2007).

Ce concept de bactéries bénéfiques fut délaissé durant presque les 60 années qui suivirent, mis à part le lancement de la marque Yakult en 1930 contenant la fameuse souche Shirota de *L. casei*. Le terme probiotique fut en effet utilisé pour la première fois en 1965 par Lilly et Stillwell pour définir une substance produite par un organisme stimulant la croissance d'un autre (Lilly & Stillwell, 1965), en effet étymologiquement, probiotique signifie « pour la vie » (du grec *pro*, pour et *bios*, la vie). Neuf ans plus tard, Parker, (1974) défini les probiotiques comme des organismes ou des substances contribuant à l'équilibre du microbiote intestinal. Par la suite Fuller, (1989) parla de microorganismes vivants conférant un effet bénéfique sur l'hôte en améliorant la flore bactérienne. Enfin en 1998, les probiotiques furent définis comme des aliments contenant des bactéries vivantes et conférant un impact bénéfique sur la santé (Salminen *et al.*, 1998). Il devint évident que la recherche et les avancées dans le domaine des probiotiques étaient en plein essor, si bien qu'en 2001, après une demande de l'Argentine et le soutien de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture et de l'Organisation Mondiale de la Santé (FAO/WHO), un comité d'expert fut réuni afin d'adopter une définition consensus sur les probiotiques. Ce comité défini les probiotiques comme des « microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité suffisante, exercent des effets positifs sur la santé de l'hôte, au-delà des effets nutritionnels traditionnels » (FAO/WHO, 2001). L'année suivante, un groupe de travail défini les règles pour l'évaluation des critères probiotiques de souches isolées à partir de produits alimentaires (FAO/WHO, 2002).

Cette définition des probiotiques fut largement acceptée par l'ensemble des acteurs concernés par le domaine. Elle a subi néanmoins une légère modification grammaticale en 2013-2014 par un comité d'experts organisé par l'Association Scientifique Internationale pour les Probiotiques et Prébiotiques (International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics, ISAPP) qui précisa les conditions d'application du terme probiotique après plusieurs problèmes de mauvaises utilisations. Certains produits comme les produits fermentés contenant des communautés microbiennes non caractérisées ou encore les greffes de microbiotes fécaux ne sont pas considérés comme probiotiques selon le comité (**Figure 28**) (Hill *et al.*, 2014; Hill & Ellen Sanders, 2013).

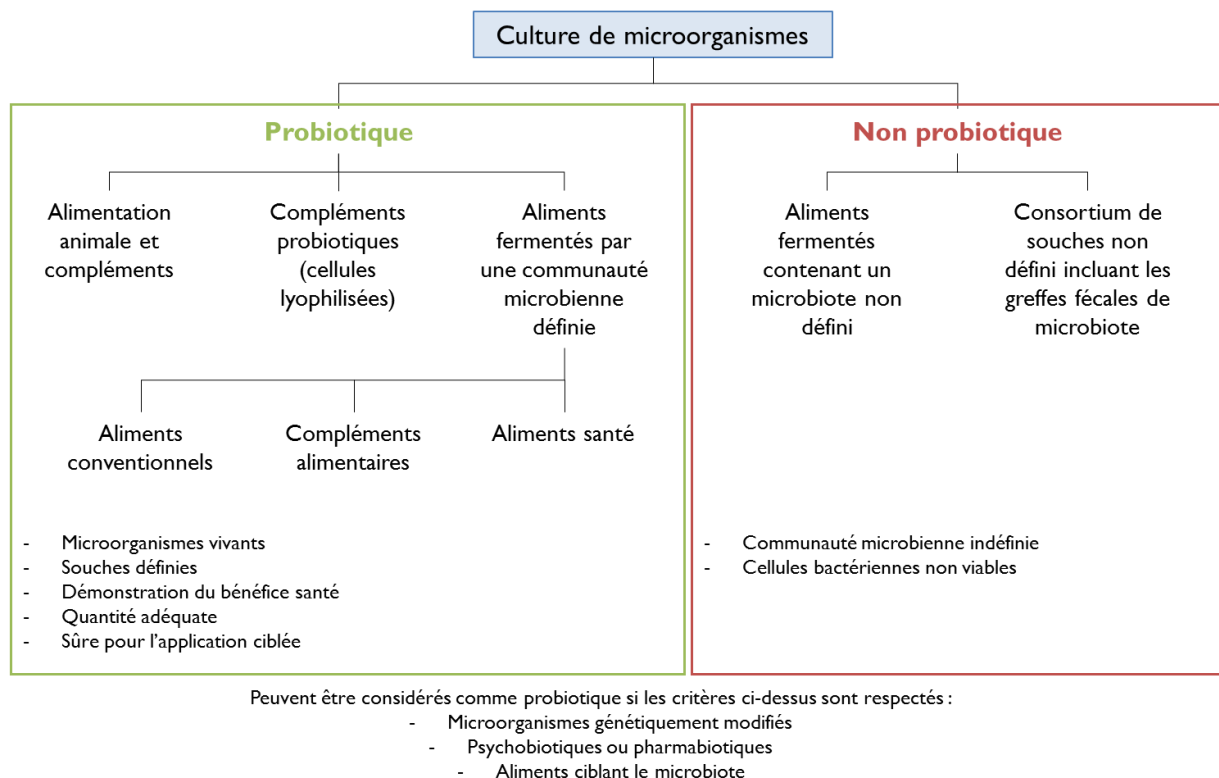


Figure 28 : Définition des probiotiques et produits associés
D'après Hill *et al.*, (2014).

La redéfinition du concept fut très bien acceptée, ainsi d'après la définition, être un probiotique est une caractéristique spécifique à la souche microbienne, c'est-à-dire que la propriété probiotique, si correctement caractérisée, ne peut être extrapolée à d'autres souches. Il est nécessaire de démontrer scientifiquement l'efficacité de la souche dans sa contribution au bénéfice santé observé. La définition n'est pas propre aux applications alimentaires ou à une action au niveau intestinal, mais également aux applications pharmaceutiques, ou à des actions

extra intestinale telle qu'au niveau de la peau, des voies respiratoires, du sang ou encore des voies uro-génitales.

De plus, en accord avec la définition, un probiotique doit être vivant, ou sous forme de cellules viables ce qui n'inclut pas les cellules bactériennes mortes ou des composants cellulaires (Sanchez *et al.*, 2017).

2.2.2. Les probiotiques en quelques chiffres

D'après Saad *et al.*, (2013), on compte environ 30 espèces différentes de microorganismes utilisés comme probiotiques (**Tableau 7**). Les espèces prédominantes font partie des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. A ce nombre s'ajoute les espèces appartenant aux probiotiques de nouvelles générations (Next Generation Probiotics, NGP), pour la plupart isolés à partir de microbiotes humains comme les *Bacteroidetes*, les *Faecalibacterium* ou encore les *Clostridium* (O'Toole *et al.*, 2017). En termes d'indicateurs bibliométriques, on compte 16.064 articles, contenant le terme probiotique, publiés entre 2000 et 2016 dont 9.811 concernent les *Lactobacillus* et 3.463 le genre *Bifidobacterium* (O'Toole *et al.*, 2017).

Tableau 7 : Microorganismes utilisés comme probiotiques.

NGP : Next Generation Probiotics.

D'après Saad *et al.*, (2013).

Lactobacillus	Bifidobacterium	Autres bactéries lactiques	Autres
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> Nissle
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	NGP
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. farciminis</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>	
<i>L. fermentum</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. thermophilum</i>		
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

Déoulant de ces travaux, il existe aujourd'hui des centaines de souches probiotiques commercialisées, soit sous forme de compléments alimentaires ou incluses dans des préparations alimentaires ou autres (Del Piano *et al.*, 2006; Toscano *et al.*, 2017). En 2015, près de 4 millions d'adultes américains consommaient des probiotiques ou prébiotiques en complément de leur alimentation, soit 4 fois plus qu'en 2007. En 2014, les ventes de souches probiotiques ont augmenté de 14,2 % aux Etats-Unis avec 1,4 milliards de dollars de vente (Parker *et al.*, 2018), et le marché global devrait atteindre 46,55 milliards de dollars en 2020 (O'Toole *et al.*, 2017). Ces chiffres indiquent que le marché des probiotiques tend à s'accroître et surtout se diversifier.

Les probiotiques confèrent différentes activités sur la santé (**Figure 29**). Elles sont sous divisées en 3 catégories selon l'ISAPP (Hill *et al.*, 2014; Sanchez *et al.*, 2017), les activités générales, les fréquentes et enfin les activités rares.

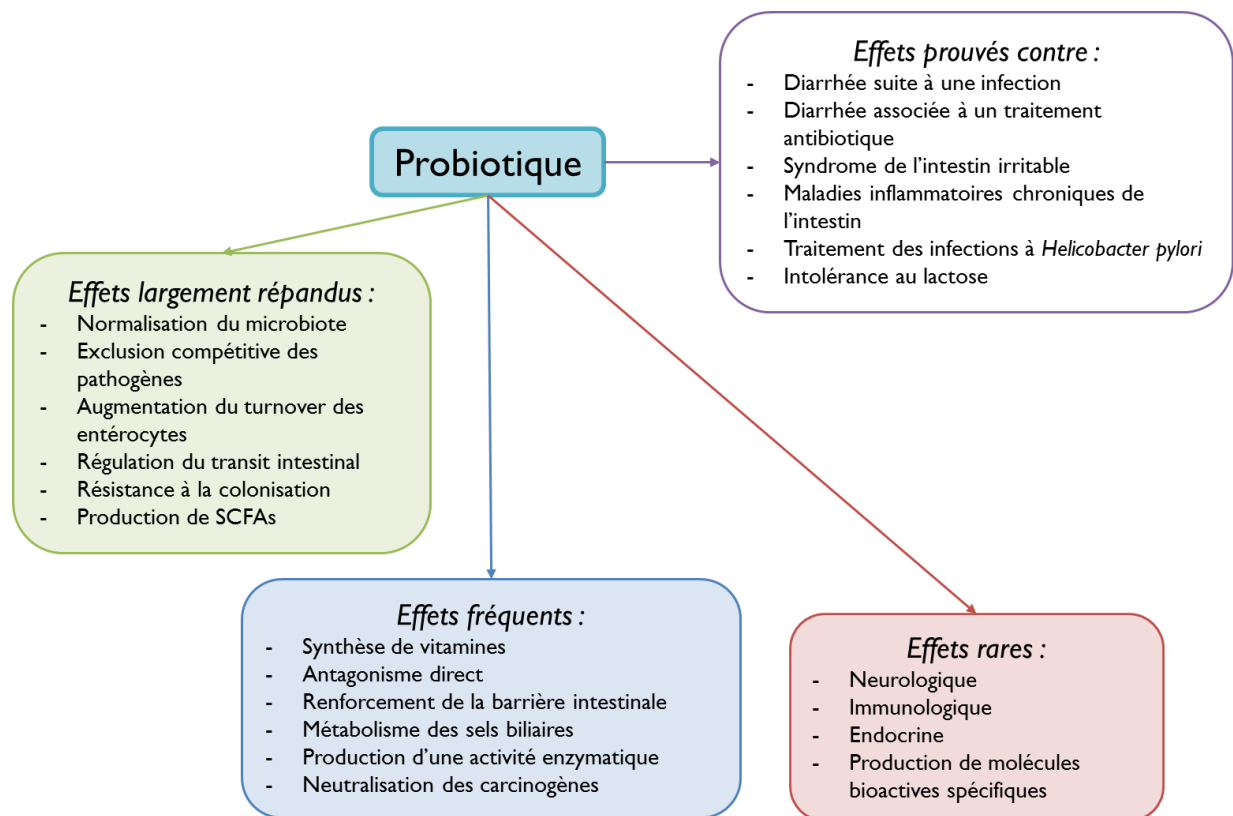


Figure 29 : Effets bénéfiques des probiotiques sur la santé selon l'ISAPP.

Sont distingués les effets largement répandus, les effets fréquents et enfin les effets rares. Les probiotiques ont démontrés leur efficacité dans le traitement et la prévention de certaines pathologies.

D'après Sanchez *et al.*, (2017).

Les allégations générales concernent les effets largement répandus et retrouvés communément parmi les différents organismes probiotiques. Elles sont au nombre de 6 : la normalisation d'un microbiote déséquilibré, l'exclusion compétitive des pathogènes, l'augmentation du turnover des entérocytes, la régulation du transit intestinal, la résistance à la colonisation et enfin la production de SCFAs. Les effets fréquents sont les activités généralement retrouvées au sein d'une même espèce, on retrouve ainsi la synthèse de vitamines, l'antagonisme direct, le renforcement de la barrière intestinale, le métabolisme des sels biliaires, la production d'une activité enzymatique et la neutralisation des carcinogènes. On retrouve enfin 4 activités santé dites rares, car propres à des souches spécifiques, les effets neurologiques (on parle alors de psychobiotique), immunologiques, endocrines, et la production de molécules bioactives spécifiques.

Du point de vue des autorités, ces activités ne sont pas toutes reconnues, ceci par manque de preuves scientifiques suffisantes, notamment d'études cliniques permettant de confirmer l'apport bénéfique des probiotiques sur l'homme. Selon l'ISAPP, 6 activités sont reportées pour les probiotiques comme étant prouvées par des études cliniques robustes. Certaines souches probiotiques sont ainsi capables de, traiter les diarrhées survenues suite à une infection (celles apparaissant après un traitement antibiotique) traiter le syndrome de l'intestin irritable (Irritable Bowel Syndrome, IBS), traiter les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICIs) comme la maladie de Crohn, traiter les infections à *Helicobacter pylori*, et enfin améliorer la digestion du lactose chez les personnes intolérantes (Sanchez *et al.*, 2017). Un des challenges à relever pour les scientifiques et industriels travaillant sur les probiotiques est d'apporter des preuves robustes quant aux bénéfices santé conférés par ces organismes. Ces preuves sont maintenant nécessaires pour obtenir l'allégation santé d'intérêt pour la commercialisation de la souche probiotique. En 2010, l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (European Food Safety Authority, EFSA) a reçu près de 800 demandes d'allégations santé à approuver, dont certaines très courantes comme la capacité de certaines souches à stimuler le système immunitaire de l'hôte. Le groupe rejeta toutes les allégations, à l'exception de l'effet générique des yaourts conféré par le duo *L. delbrueckii* ss. *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*, des souches permettant d'améliorer la digestion du lactose (EFSA, 2011). Les effets prétendus, pourtant présents sur les emballages de divers produits pendant plusieurs années, ont été jugés trop généralistes et pas assez convaincants scientifiquement pour être admissibles. Même les allégations de la souche *L. casei* Shirota de Yakult furent rejetées par manque d'évidences scientifiques (Hoffman *et al.*, 2012). La prétention d'allégations santé pour la

commercialisation de souches probiotiques est ainsi devenue limitée au sein de l'Union Européenne. Ces rejets ont été jugés comme peu pertinents en comparaison avec des allégations conférées à d'autres substances. Les données concernant les effets bénéfiques de certaines souches probiotiques étant plus nombreuses et de meilleures qualités que les résultats concernant d'autres substances alimentaires utilisées comme compléments santé (minéraux ou vitamines par exemple) (Petschow *et al.*, 2013).

Ces données mettent en exergue les nombreuses applications possibles des probiotiques dans différents domaines justifiant la diversification de l'offre sur ce marché. Les études cliniques relatives aux bénéfices santé sont de plus en plus nombreuses mais souffrent encore d'un manque de reconnaissance par les différentes autorités. Malgré ces limitations, l'abondance d'études cliniques ne montrant aucun effets délétères suite à l'administration des probiotiques, supporte l'idée de continuer l'utilisation et la recherche dans ce domaine (Tanner *et al.*, 2018).

2.3. Du concept à l'effet métabolique

2.3.1. Maintien des fonctions et du métabolisme intestinal

L'intégrité de la barrière intestinale joue un rôle important dans le maintien d'un bon état de santé. Ceci est attribué à la formation de jonctions serrées entre des cellules épithéliales adjacentes dans l'intestin qui vont empêcher le passage de substances, d'allergènes alimentaires ou encore de pathogènes dans la circulation systémique. Une perturbation de la barrière intestinale peut le rendre perméable et conduire à des diarrhées, inflammations ou des infections si un pathogène réussit à traverser l'épithélium intestinal (Bermudez-Brito *et al.*, 2012). Certaines souches bactériennes sont capables de renforcer l'épithélium intestinal, par exemple, la souche MI13 de *L. rhamnosus* est capable d'apporter une protection ou améliorer l'intégrité d'une monocouche de cellules Caco-2 exposée à l'éthanol (Jose *et al.*, 2017). Sur le même modèle Caco-2, le probiotique *L. rhamnosus* GG est également capable d'accroître l'intégrité de la barrière intestinale (Ramos *et al.*, 2013). Cependant, le mécanisme d'action par lequel les probiotiques renforcent l'épithélium intestinal n'est pas encore complètement caractérisé. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer le phénomène (**Figure 30**), il est d'ailleurs probable que, en fonction des souches utilisées, toutes ces observations soient responsables des impacts observés, confirmant les effets souches dépendants des probiotiques.

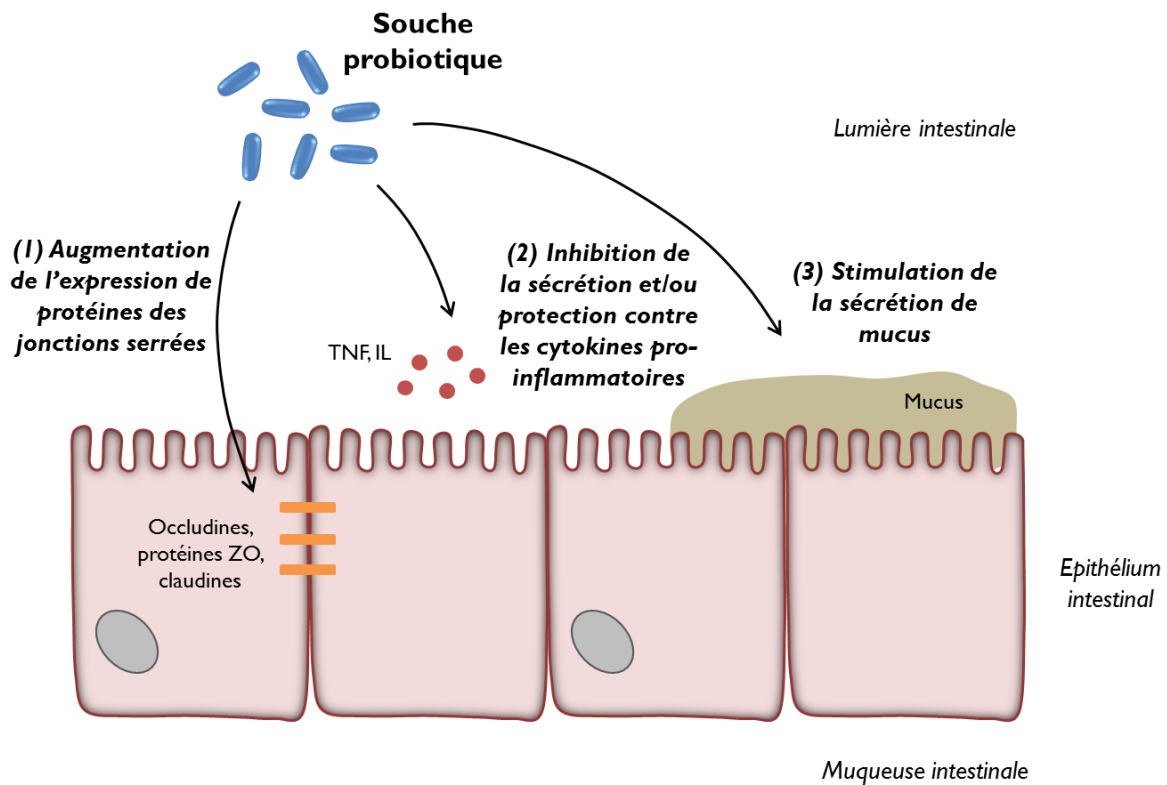


Figure 30 : Impacts de souches probiotiques sur l'intégrité d'épithélium intestinal.

Les probiotiques sont en effet capables d'améliorer l'intégrité de la barrière intestinale par différents mécanismes : le renforcement des jonctions serrées (1), l'atténuation de la réponse inflammatoire (2) ou encore en stimulant la production de mucus (3).

ZO : Zonula Occludens, TNF : Tumor Necrosis Factor, IL : Interleukine.

Certaines souches probiotiques sont capables de stimuler l'expression des protéines impliquées dans les jonctions serrées, entraînant un renforcement de la barrière intestinale. C'est le cas de la souche MB452 de *L. plantarum* qui entraîne une augmentation de la production d'occludines ainsi que certaines protéines de la zonula occludens (ZO-1, ZO-2) après contact sur cellules Caco-2 (Anderson *et al.*, 2010), cet effet a également été démontré par une étude clinique (Ulluwishewa *et al.*, 2011). La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires est également un facteur impactant la barrière intestinale, en effet les inflammations intestinales peuvent causer des dommages à l'épithélium et le rendre plus perméable (Carvalho & Abdalla Saad, 2013). Il a été montré qu'une souche de *Bifidobacterium bifidum* est capable de protéger *in vitro* des cellules intestinales traitées au TNF- α (Hsieh *et al.*, 2015). Les probiotiques sont également capables de stimuler la sécrétion de mucines afin de renforcer la barrière intestinale. En effet, les souches *L. plantarum* 299v et *L. rhamnosus* GG stimulent la sécrétion extracellulaire de la mucine MUC3 chez les cellules HT-29 MTX (Mack *et al.*, 2003).

L'intestin joue un rôle prépondérant dans le métabolisme des lipides, au cours de ce métabolisme la matière grasse apportée par l'alimentation s'émulsifie dans l'intestin et entraîne la formation de micelles, phénomène facilitée par l'action des sels biliaires. Cette étape permet l'absorption de la matière grasse, notamment celle du cholestérol. Son rôle est essentiel dans la constitution des membranes cellulaires mais son accumulation trop importante dans le sérum est responsable de maladies coronariennes (Aggarwal *et al.*, 2013). Certains probiotiques présentent une activité enzymatique particulière, conférée par une hydrolase de sels biliaires (Bile Salt Hydrolase, BSH, EC 3.5.1.24, cholyglycine hydrolase). Cette enzyme entraîne la déconjugaison des sels biliaires en acides biliaires, des molécules bien moins effectives que les sels pour l'émulsification de la matière grasse. Ceci conduit alors à une diminution globale des lipides absorbés par l'intestin dont le cholestérol (Liong & Shah, 2005). Ainsi, certaines souches probiotiques présentent des effets hypocholestérolémiantes comme le *L. fermentum* KC5b (Pereira & Gibson, 2002), le *L. casei* NCDC-19 ou encore une souche de levure *Saccharomyces boulardii* (Aggarwal *et al.*, 2013).

Dans la même optique, l'apport de probiotiques peut bénéficier à la régulation de l'homéostasie énergétique. Les organismes aérobies comme l'homme utilisent le cycle de Krebs pour subvenir à leur besoin énergétique à partir des métabolismes des sucres, des acides aminés ou des lipides. Les différentes réactions du cycle de Krebs nécessitent de nombreux composés qui peuvent provenir de sources exogènes comme l'alimentation ou encore la production de SCFAs et de vitamines par le microbiote intestinal ou des souches probiotiques (Leblanc *et al.*, 2017). La production de SCFAs dans l'intestin est un phénomène bien connu, ces métabolites sont ensuite absorbés par les cellules intestinales où ils vont jouer différents rôles comme la régulation de l'énergie ou la modulation de l'inflammation intestinale (Sanders *et al.*, 2018). Les probiotiques peuvent également synthétiser des vitamines des groupes B et K parmi ces molécules, la thiamine (vitamine B1) joue un rôle majeur dans le métabolisme énergétique puisqu'elle est utilisée comme co-facteur de la réaction permettant le clivage du pyruvate ou de l' α -ketoglurate, soient deux étapes différentes du cycle de Krebs. Ce phénomène peut également s'appliquer à d'autres vitamines du groupe B. La souche probiotique *L. rhamnosus* GG est capable de synthétiser *de novo* du folate (vitamine B9), de la riboflavine (vitamine B12) et en plus faible quantité de la thiamine. Des souches de *Bifidobacterium longum* et *B. bifidum* sont capables de synthétiser des quantités significatives de thiamine (Leblanc *et al.*, 2017). En plus de ces activités, certaines souches probiotiques sont capables de réguler la réponse postprandiale notamment via la stimulation de sécrétion des hormones CCK et GLP-1 libérées suite à

l'ingestion de nutriments et induisant l'état de satiété. Cet effet a été démontré *in vitro* avec les souches *L. gasseri* CMUL34 et *L. acidophilus* CMUL67 sur cellules STC-1, effet associé à une augmentation des taux d'ARNm des gènes associés (Belguesmia *et al.*, 2016). Une étude *in vivo* sur un modèle de souris obèses, a montré l'impact positif d'une souche de *L. mali* APS1 isolée du kéfir, sur la sécrétion du GLP-1 et la résistance à l'insuline. Le traitement a également permis d'améliorer la prise de poids et le stockage de la matière grasse (Lin *et al.*, 2016). Une autre étude clinique sur le même modèle de souris obèse a également permis de mettre en évidence que différentes souches probiotiques induisent une amélioration de l'état de dysbiose induit par l'obésité (Alard *et al.*, 2015). Les effets des probiotiques sur le métabolisme énergétique et la prise de poids (**Figure 31**) encouragent la recherche pour le développement d'approches préventives contre l'obésité ou encore le diabète de type 2 par utilisation de souches probiotiques (Aggarwal *et al.*, 2013).

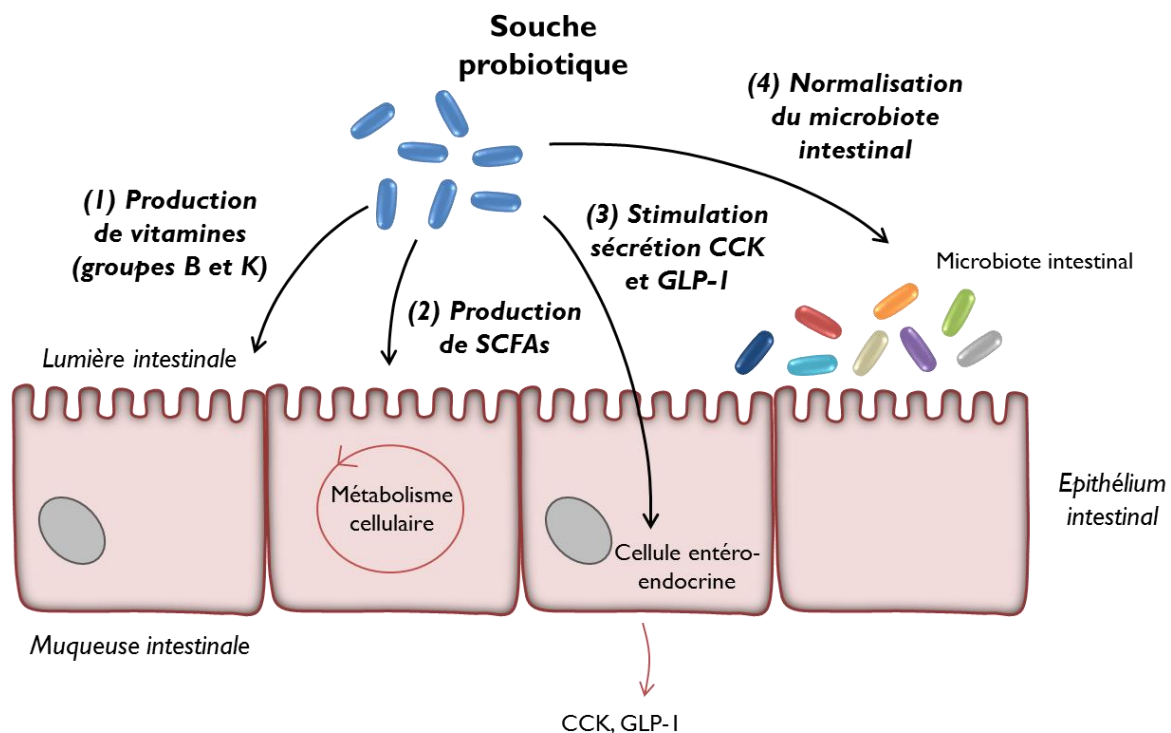


Figure 31 : Impacts de souches probiotiques sur la régulation de l'homéostasie énergétique.

Les probiotiques peuvent réguler cette homéostasie par différents mécanismes : la production de vitamines (1) ou de SCFAs (2), la stimulation de la sécrétion de CCK et de GLP-1 (3) et enfin la normalisation du microbiote intestinal (4).

SCFAs : Short Chain Fatty Acids, CCK : Cholecystokinine, GLP-1 : Glucagon Like Peptide 1.

2.3.2. Protection contre les pathogènes

Les probiotiques confèrent à l'intestin une protection naturelle contre les pathogènes, il s'agit d'un phénomène bien connu qui peut se présenter sous deux formes, la synthèse de composés antimicrobiens dans l'intestin, ou l'exclusion compétitive des pathogènes par les probiotiques qui empêchent ainsi leur installation (Bermudez-Brito *et al.*, 2012).

Présents dans l'intestin, les probiotiques peuvent sécréter différentes substances antimicrobiennes comme des acides organiques, des bactériocines (de natures peptidiques) ou encore de l' H_2O_2 (Di Cerbo *et al.*, 2016). Ces composés vont permettre d'exclure l'installation de souches délétères ou pathogènes au niveau de la muqueuse intestinale. Les acides biliaires produits par déconjugaison des sels biliaires sont également des substances antimicrobiennes (Oelschlaeger, 2010). Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens de faibles poids moléculaire, produits par les bactéries à Gram-négatif et Gram-positif (Dridier & Rebuffat, 2011). Elles agissent sur les cibles par plusieurs mécanismes incluant la formation de pores dans la membrane ou en inhibant la synthèse de la paroi cellulaire (Bermudez-Brito *et al.*, 2012). La production de bactériocines a été démontrée chez plusieurs souches de *Lactobacilles* (Avonts *et al.*, 2004) et certaines peuvent inhiber la croissance de différents pathogènes comme *Listeria*, *Salmonella* ou *Campylobacter* (Fernandez *et al.*, 2003; Mikelsaar & Zilmer, 2009; Pan *et al.*, 2009). La production d'acides organiques entraînent une diminution localisée du pH de la lumière intestinale permettant l'inhibition de la croissance de certains microorganismes pathogènes (Di Cerbo *et al.*, 2016).

L'exclusion compétitive des pathogènes est le résultat de différents mécanismes et propriétés des probiotiques pour inhiber l'adhésion des pathogènes. Elle est basée sur l'interaction entre bactéries par la compétition pour différents substrats ou nutriments ainsi que pour les sites d'adhésion à la muqueuse intestinale. Pour obtenir un avantage compétitif, les souches bactériennes peuvent également modifier leur environnement pour le rendre moins favorables au développement des souches pathogènes. La production d'acides ou de bactériocines est un exemple de ce phénomène (Bermudez-Brito *et al.*, 2012). Hirano *et al.*, (2003), ont montré qu'une souche de *L. rhamnosus*, très adhérente aux cellules intestinales, était capable d'inhiber l'internalisation d'*Escherichia coli* entérohémorragique par des cellules épithéliales humaines.

2.3.3. Effets immunomodulateurs et impacts sur l'inflammation

Dans certains cas, les probiotiques peuvent réguler la réponse immunitaire de l'hôte et ainsi affecter la physiologie intestinale. Du fait des impacts différents des souches probiotiques sur

l'immunité, cet effet est particulièrement souche spécifique. Le système immunitaire peut être décomposé en deux catégories. La réponse adaptative dépendante des lymphocytes B et T impliquée dans la reconnaissance d'antigènes spécifiques. La réponse innée, quant à elle, réponds à des structures communes appelées motifs moléculaires associés aux pathogènes (Pathogen Associated Molecular Pattern, PAMPs) reconnus par les récepteur de l'immunité innée (Pattern Recognition Receptor, PRRs). Les PRR les plus étudiés sont les récepteurs Toll-Like (Toll-Like Receptor, TLRs) ou encore les récepteurs intracellulaires NOD like (Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Containing Protein, NOD) (Bermudez-Brito *et al.*, 2012). Dans l'intestin, les cellules bactériennes interagissent avec les cellules épithéliales mais également avec les cellules dendritiques, les monocytes/macrophages et les lymphocytes. Par adhésion directe, sécrétion de métabolites ou fragments de paroi reconnus par les récepteurs de l'immunité, ces interactions conduisent à différentes cascades de signalisation et ainsi des effets immunomodulateurs (Oelschlaeger, 2010). Les immunomodulations de l'intestin positives ou négatives, ont des impacts directs sur l'inflammation du tube digestif via la sécrétion de différentes cytokines.

A titre d'exemple, Grangette *et al.*, (2005) ont étudié l'impact d'une souche de *L. plantarum* NCIMB8826 aux propriétés anti-inflammatoires. L'acide téichoïque présent au niveau de la paroi bactérienne de la souche est responsable de cette activité. Les auteurs ont ainsi créé un mutant de la souche incorporant moins de D-alanine dans sa synthèse d'acide téichoïque que la souche d'origine. Le défaut de biosynthèse chez le mutant a profondément modifié sa capacité d'immunomodulation sur des monocytes pour lesquels la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires a été diminuée en comparaison avec la souche sauvage. La sécrétion d'interleukine-10, une cytokine anti-inflammatoire, a également été stimulée par le mutant. L'effet observé est dépendant du récepteur TLR-2, ce qui démontre l'impact de la voie de signalisation sur l'effet probiotique de la souche de *L. plantarum*. Il a été démontré lors d'une étude clinique, que la souche *L. casei* Shirota est capable de stimuler la sécrétion d'interleukine-12 et ainsi améliorer l'activité des cellules Natural Killer. Différentes souches de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* ont été capables de moduler *in vitro* l'activité de macrophages et ainsi de stimuler la production d'interleukine-12 (Mokrozub *et al.*, 2015). L'étude du probiotique *L. salivarius* Ls33 a montré que son pouvoir de protection vis-à-vis de l'inflammation était lié à une stimulation de la sécrétion d'interleukine-10 dépendante du NLR, NOD2. Ce récepteur reconnaît spécifiquement les muro-dipeptides composants du peptidoglycane des bactéries. L'étude structurale de la paroi de cette souche probiotique a montré la présence d'un muro-

peptide particulier reconnu par NOD2 conduisant à la maturation de lymphocytes T régulateurs (Fernandez *et al.*, 2011).

Les impacts des probiotiques sur le système immunitaire et l'inflammation intestinale, favorisent l'utilisation de ces souches dans certaines pathologies intestinales telles que les MICIs ou l'IBS. Ces maladies étant également associées à des perturbations du microbiote intestinal ce qui justifie d'autant plus l'utilisation de probiotiques comme méthodes préventive ou thérapeutique (Sanchez *et al.*, 2017).

2.3.4. Impacts sur le système nerveux

A l'instar du microbiote intestinal, les probiotiques peuvent entraîner des impacts au niveau neurologique. Tout comme les actions immunomodulatoires ou anti-inflammatoires, il s'agit d'un effet particulièrement souche dépendant. Les travaux réalisés dans ce domaine ont conduit à l'émergence du concept de psychobiotiques, des probiotiques capables de moduler le mental et/ou l'humeur de l'hôte (Tanner *et al.*, 2018). Ces organismes impactent l'axe intestin-cerveau et peuvent soulager des syndromes et émotions comme le stress, l'anxiété ou la dépression. Différentes études ont montré l'impact de souches probiotiques sur le système nerveux entérique, le système nerveux autonome ou le système nerveux central (Saulnier *et al.*, 2013), néanmoins tous les mécanismes d'action ne sont pas connus. Ces travaux montrent le potentiel de souches probiotiques d'agir au-delà de l'intestin et de traiter ou prévenir des pathologies liées au système nerveux, comme la dépression. La recherche sur les psychobiotiques est encore relativement récente, de futurs travaux permettront d'approfondir les connaissances dans ce domaine (Tanner *et al.*, 2018).

2.3.5. Absorption minérale et action sur le métabolisme osseux

Un effet moins reconnu des probiotiques concerne leur capacité à affecter le métabolisme minéral, notamment celui du calcium, et ainsi impacter la physiologie osseuse (Scholz-Ahrens *et al.*, 2007). Un faible nombre d'études, *in vivo* pour la plupart, ont évalué ce phénomène. Des modèles de souris ou rates, ayant subi une ovariectomie et développant ainsi un syndrome ostéoporotique, existent afin d'évaluer ces effets (Parvaneh *et al.*, 2014).

Kruger *et al.*, (2009), ont étudié l'impact de la souche *L. rhamnosus* HN001 sur le métabolisme osseux à la fois sur des rats mâles en croissance et des femelles ovariectomisées. Les auteurs ont observé chez les rates une augmentation de la densité minérale osseuse (BMD) ainsi qu'une diminution de la perte osseuse induite par l'ovariectomie. Chez les mâles, une augmentation de

la rétention du calcium et du magnésium a été observée pour les sujets traités mais les différences de prise alimentaire des animaux ont rendu l'étude non conclusive. Une autre étude a montré l'impact d'une souche de *Bifidobacterium longum* sur les rates ovariectomisées (Parvaneh *et al.*, 2015). L'administration de la souche a permis d'augmenter le taux d'ostéocalcine, hormone démontrant l'activité des ostéoblastes ainsi qu'une diminution des marqueurs de l'activité des ostéoclastes. La souche bactérienne a également permis d'améliorer la microstructure des os, d'augmenter la BMD ainsi que l'expression des gènes *sparc* et *bmp-2*, impliqués dans les processus de cicatrisation et de formation osseuse. L'étude conclue que la souche bactérienne permet de diminuer la perte osseuse subie suite à l'ovariectomie, en diminuant la résorption osseuse et en favorisant sa formation.

Ces travaux suggèrent que certaines souches probiotiques sont capables de réguler le métabolisme osseux et prévenir sa résorption, les résultats sont prometteurs et pourront conduire à des approches de prévention du syndrome ostéoporotique chez les personnes âgées par les probiotiques. Cependant, le ou les mécanismes d'action de ces souches restent encore inconnus. Plusieurs hypothèses ont été émises afin d'expliquer ce phénomène (**Figure 32**).

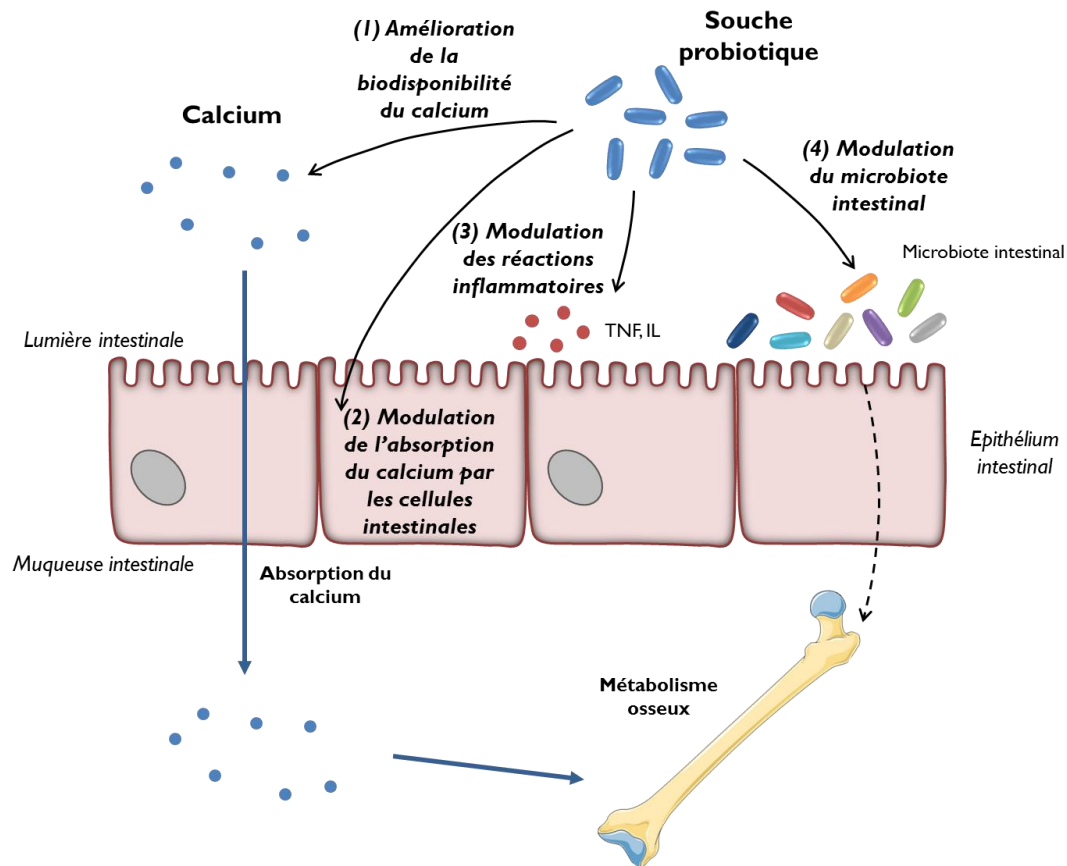


Figure 32 : Impacts de souches probiotiques sur l'absorption intestinale du calcium.

Les probiotiques peuvent impacter le métabolisme osseux par l'amélioration de la solubilité du calcium (1) ou la modulation de son absorption (2), par la modulation des réponses inflammatoires (3) et enfin via un impact sur le microbiote intestinal (4).

TNF : Tumor Necrosis Factor, IL : Interleukine.

L'amélioration de la biodisponibilité du calcium dans l'intestin par les probiotiques est une des approches envisagées, conduisant à une augmentation de l'absorption du calcium par l'intestin. Les souches bactériennes peuvent en effet produire des SCFAs conduisant ainsi à une diminution locale du pH dans la lumière intestinale ce qui améliore la solubilité du calcium et donc son absorption (Scholz-Ahrens *et al.*, 2007). De la même manière, les souches peuvent produire des phytases, qui sont des enzymes capables de libérer le calcium complexé par le phytate dans les matrices alimentaires végétales, notamment les céréales (Parvaneh *et al.*, 2014). L'impact direct des souches bactériennes sur les cellules intestinales conduisant à une augmentation de l'absorption du calcium, n'est pas non plus une hypothèse à exclure. Les travaux de Gilman & Cashman, (2002) ont permis de mettre en évidence *in vitro* l'impact d'une souche de *L. salivarius* sur l'incorporation du calcium par les cellules Caco-2. L'effet anti-inflammatoire de certaines souches probiotiques pourrait également l'expliquer l'impact observé sur le métabolisme osseux. En effet, la diminution des inflammations intestinales

conduit à une amélioration de ses fonctions comme l'absorption du calcium (Parvaneh *et al.*, 2014). Cet effet a été observé *in vivo* par McCabe *et al.*, (2013) qui ont étudié l'impact de la souche *L. reuteri* ATCC PTA6475, une souche connue pour supprimer la sécrétion de TNF- α , chez des souris adulte. L'étude a montré que la consommation de la souche diminuait l'inflammation induite par le TNF- α , de plus, une augmentation de la BMD, une amélioration de la structure des os et la détection de marqueurs de l'activité des ostéoblastes ont été observées. De façon intéressante, cet impact de la souche n'a été observé que chez les souris mâles. Par ailleurs, la première étude clinique étudiant l'impact de probiotiques sur le squelette humain a été réalisée récemment à partir de la même souche de *L. reuteri*, le traitement probiotique pendant 12 mois, a permis de réduire significativement la perte osseuse chez des femmes âgées de 75 à 80 ans ayant une faible BMD (Nilsson *et al.*, 2018).

L'ensemble de données présentées montrent que les souches probiotiques peuvent affecter le métabolisme osseux même si les mécanismes d'action sont encore non élucidés. L'activité des probiotiques sur ce métabolisme est encore peu reconnu aujourd'hui. Il est fortement probable que ces effets soient souche dépendants et résultent d'interactions complexes, entre l'action des probiotiques sur les cellules intestinales mais également sur le système immunitaire, ou encore sur le microbiote intestinal (McCabe & Parameswaran, 2018), ces effets cumulés impactant l'absorption du calcium et l'activité osseuse (**Figure 33**). Plusieurs études seront requises afin de comprendre ces synergies permettant à certaines souches, d'impacter le système osseux.

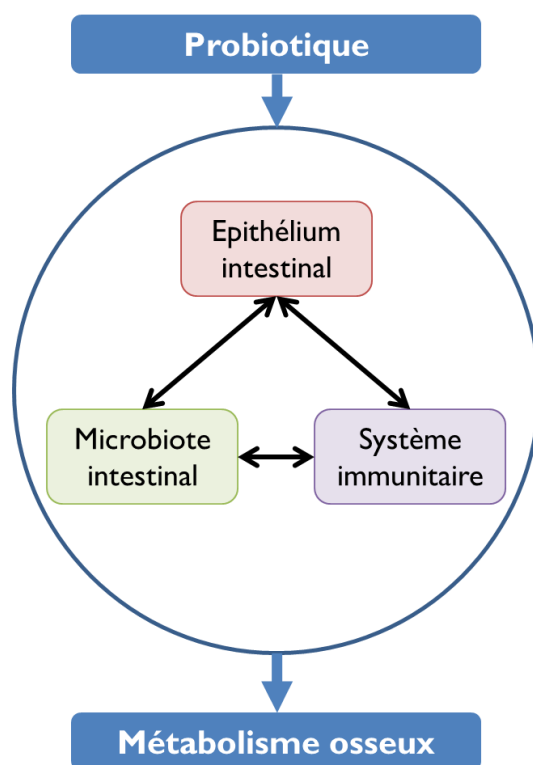


Figure 33 : Effets de souches probiotiques sur le métabolisme osseux.

L'ingestion de probiotiques influence la composition du microbiote, l'intégrité de la barrière intestinale ainsi que les inflammations intestinales. L'ensemble modulant le métabolisme osseux.

3. La recherche de souches probiotiques

3.1. Les règles générales

Suite à la définition des probiotiques apportés par la FAO/WHO en 2001, des règles générales pour l'évaluation et l'étude des probiotiques ont été publiées l'année suivante (FAO/WHO, 2002). Ces règles ont été reprises par Anukam & Reid, (2007), en plusieurs points (**Figure 34**).

Règles générales :

- Un probiotique est un organisme vivant
- Identifier l'organisme au niveau de l'espèce
- Prouver l'absence de toxicité
- Démontrer le bénéfice physiologique

Origines et identités des probiotiques :

- L'origine d'une souche ne justifie pas son activité
- La souche doit être caractérisée par des méthodes génotypiques et phénotypiques
- La souche doit être désignée par un code spécifique, le dépôt dans une collection internationale est recommandé

Règles de sureté des probiotiques :

- Confirmation de l'absence de toxicité
- Etude clinique requise pour les nouvelles souches (ou souches inhabituelles)
- Déterminer la résistance aux antibiotiques
- Posologie claire

Efficacité des probiotiques :

- Etude soigneusement établie, contrôlée par un placebo avec une force statistique suffisante
- Développement de nouveaux critères par les autorités pour permettre aux aliments et compléments alimentaires de prétendre à des allégations santé

Figure 34 : Règles pour l'évaluation de souches probiotiques.
D'après FAO/WHO, (2002) et Anukam & Reid, (2007).

Pour pouvoir définir une souche comme probiotique, il existe 4 règles de base : cette souche doit être vivante, être identifiée au niveau de l'espèce, avoir prouvé une absence de toxicité et enfin avoir prouvé un bénéfice physiologique. Le tout, en utilisant un nombre défini de cellules bactériennes viables, dans une matrice bien définie et dont l'efficacité est contrôlée par un placebo et/ou une thérapie standard si la finalité est de traiter une maladie ou un syndrome.

Il existe ensuite des règles concernant l'origine et l'identité de la souche, premièrement l'origine de la souche ne peut être un justificatif de son activité. De plus, il est préférable de caractériser l'organisme au niveau de la souche. Ceci doit être fait par combinaison de techniques génotypiques et phénotypiques, comme les techniques d'amplification ADN mais également en évaluant l'activité de certaines enzymes comme la production de lactase ou la déconjugaison des sels biliaires (Shewale *et al.*, 2014). Enfin, il est fortement recommandé par la FAO/WHO de déposer les souches d'intérêts dans une collection internationale.

Les règles de sûreté des probiotiques sont les suivantes, avoir soigneusement confirmé l'absence de toxicité des cellules bactériennes en fonction de l'application visée. Les principaux genres bactériens communément utilisés comme probiotiques (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*) portent la mention Generally Regarded As Safe (GRAS), ou la mention présomption d'innocuité reconnue (Qualified Presumptions of Safety, QPS) en Europe, ce qui signifie que ces genres sont généralement reconnus comme sans impact nocif sur la santé. Dans le cas d'une nouvelle souche ou espèce, il est recommandé d'évaluer la sûreté de l'organisme par une étude clinique (phase 1). Le profil de résistance aux antibiotiques doit être réalisé même pour les organismes ayant la mention GRAS ou QPS. Il est enfin demandé d'utiliser une posologie claire surtout si des contre indications sont présentes dans l'utilisation du probiotique (cas de certaines levures).

Le dernier volet concerne l'efficacité des probiotiques, il s'agit évidemment de soigneusement établir l'étude permettant de prouver l'action de la souche d'intérêt, un contrôle placebo est nécessaire ainsi qu'une force statistique suffisante. Il est également reconnu que les autorités doivent développer de nouveaux critères pour permettre aux aliments et compléments alimentaires de prétendre à des allégations santé.

L'étude d'une souche probiotique nécessite donc d'évaluer un certain nombre de facteurs, Del Piano *et al.*, (2006) ont proposé un workflow pour la mise en évidence d'un probiotique pour une utilisation au niveau intestinal (**Tableau 8**), de l'isolation de la souche à l'étude clinique permettant de prouver son bénéfice santé. Les auteurs précisent qu'il faut évaluer la capacité de la souche à être produite à grande échelle pour la commercialisation ou même l'étude clinique. Des critères comme la tolérance des cellules bactériennes aux conditions digestives ainsi que la préparation et le stockage à long terme des cellules vivantes, sont également soulignés.

Tableau 8 : Workflow pour la mise en évidence de souches probiotiques.
D'après Del Piano *et al.*, (2006).

La naissance d'une souche probiotique	
1.	Prélèvement d'échantillons
2.	Isolement des souches
3.	Identification des souches
4.	Caractérisations génotypique et phénotypique
5.	Sélection du biotype
6.	Etude de la croissance
7.	Détermination de la résistance au jus gastrique
8.	Détermination de la résistance à la bile
9.	Détermination de la résistance aux sécrétions pancréatiques
10.	Evaluation de l'absence de toxicité
11.	Résistance à la lyophilisation
12.	Stabilité au cours du stockage
13.	Etude des capacités de micro encapsulation (et production à grande échelle)
14.	Etude de l'activité biologique <i>in vitro</i>
15.	Etude de l'activité biologique <i>in vivo</i> sur modèle animal
16.	Etude clinique

Cependant, la recherche de souches probiotiques peut conduire à certaines limitations, en effet, à partir d'un échantillon alimentaire ou biologique, plusieurs isolats peuvent être obtenus. Si on considère plusieurs prélèvements, le nombre de souches à étudier devient rapidement conséquent. A titre d'exemple, 234 souches ont été isolées à partir de différents produits brésiliens (Ramos *et al.*, 2013), et 106 souches ont pu être récupérées à partir de différents échantillons de Kimchi (mets coréen composé de piments et légumes fermentés) (Baick & Kim, 2015). Une stratégie de criblage doit donc être conduite afin de sélectionner des souches potentiellement probiotiques, et ceci de façon simple, rapide et fiable. Différents critères de sélections sont couramment utilisés dans ce but (**Tableau 9**) (FAO/WHO, 2002).

Tableau 9 : Tests utilisés pour l'étude *in vitro* de souches probiotiques.
D'après FAO/WHO, (2002).

Principaux tests <i>in vitro</i> pour l'étude de souches probiotiques
Résistance à l'acidité gastrique
Résistance à la bile
Adhésion au mucus et/ou aux cellules épithéliales
Activité antimicrobienne contre des organismes potentiellement pathogènes
Capacité d'exclusion de pathogènes
Activité d'hydrolyse des sels biliaires (BSH)
Résistance aux spermicides (pour des applications vaginales)

Néanmoins, considérant les règles énoncées précédemment, aucun des critères ne suffira à sélectionner une souche répondant à la fois à l'absence de toxicité, à la vérification de la viabilité cellulaire ainsi qu'à la preuve du bénéfice physiologique. Aujourd'hui, il n'existe aucun marqueur phénotypique permettant de prédire l'activité probiotique d'une souche *in vivo* (Kotzamanidis *et al.*, 2010; Voltan *et al.*, 2007). D'après l'analyse de la littérature et des différentes études réalisées pour la recherche et la mise en évidence de souches probiotiques, il semble qu'il existe deux grandes façons de procéder au criblage d'un panel de souches (**Figure 35**). La première consiste à cribler une collection de souches selon l'activité biologique ciblée pour ensuite déterminer les caractéristiques de la souche, notamment sa viabilité au cours de la DGI (Digestion Gastro-Intestinale) ou son absence de toxicité. A l'inverse, la seconde méthode débute par l'évaluation de critères physiques propres aux probiotiques tels que l'adhésion aux cellules intestinales ou la tolérance à la digestion. Les souches d'intérêt sont par la suite étudiées pour leurs bénéfices santé.

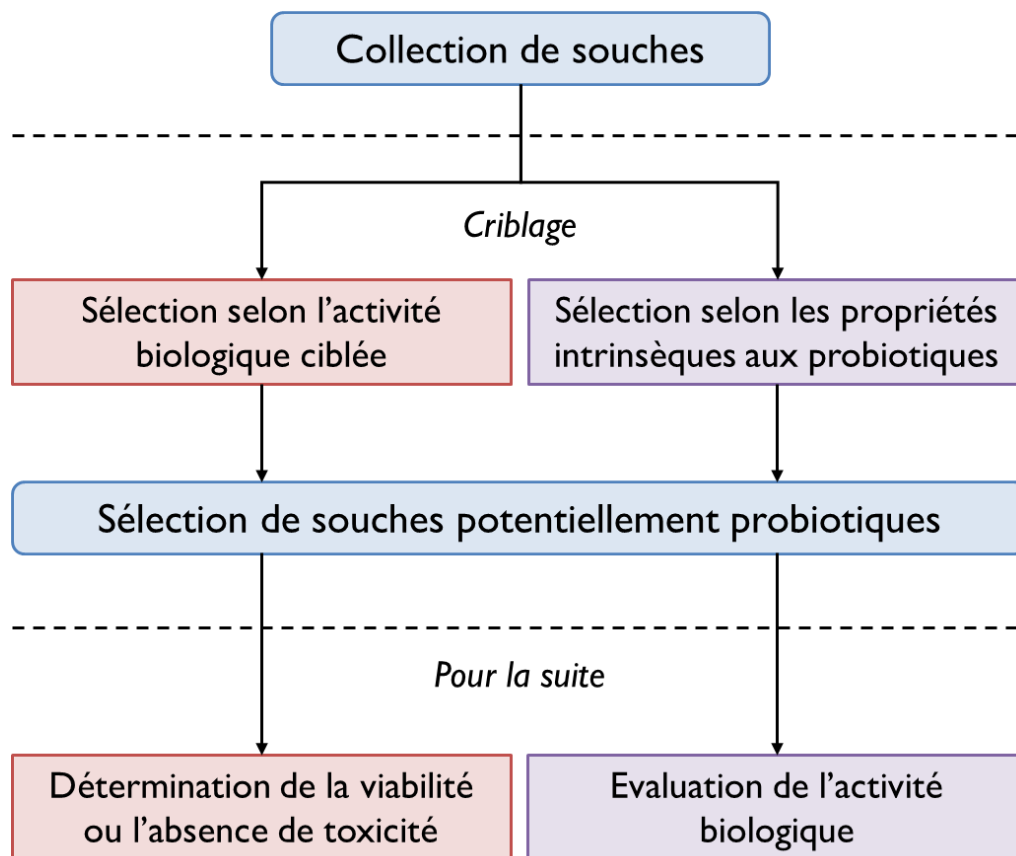


Figure 35 : Stratégies de criblages pour la sélection de souches probiotiques.

Dans un cas, l'activité biologique constitue le critère de sélection, dans l'autre méthode ce sont les propriétés intrinsèques aux probiotiques qui servent au criblage. Dans tous les cas, lorsque les souches sont sélectionnées, l'évaluation de l'activité biologique ou des caractéristiques probiotiques sera nécessaire par la suite.

3.2. La sélection selon l'activité biologique ciblée

Certaines études se concentrent avant tout à montrer l'impact des souches sur le bénéfice santé qu'elles peuvent apporter. Les probiotiques pouvant exercer de nombreux impacts sur l'hôte, différentes méthodologies de criblages peuvent être conduites.

Les critères les plus couramment utilisés sont les propriétés antimicrobiennes des souches ainsi que leur capacité d'exclusion des pathogènes, ceci dans le but de sélectionner des souches capables d'inhiber la colonisation des muqueuses par des microorganismes nocifs (FAO/WHO, 2002; Shewale *et al.*, 2014). D'autres applications et activités biologiques sont néanmoins ciblées et utilisées comme critères de sélection. Afin d'explorer le potentiel antidiabétique de différentes souches de *Bifidobacterium*, Zeng *et al.*, (2015) ont criblé un panel de 15 souches pour leur activité d'inhibition de la DPP-IV par un test *in vitro*. Ces souches ont par la suite été étudiées pour leur tolérance aux conditions gastriques et à la bile, ainsi que pour leur potentiel d'adhésion aux cellules intestinales. De la même manière, certaines souches de bactéries lactiques ont été étudiées *in vitro* pour leur capacité à assimiler le cholestérol (Bendali *et al.*, 2017; Pereira & Gibson, 2002). Dans le cadre de la prévention et le traitement des MICIs, Alard *et al.*, (2018) ont utilisé deux modèles cellulaires *in vitro* afin de cribler un groupe de 23 souches bactériennes. Les effets immunomodulateurs des souches ont été évalués après contact avec des cellules mononuclées de sang périphérique humain (majoritairement des lymphocytes et monocytes). De plus, la capacité des souches à prévenir la perméabilisation d'une monocouche de cellules Caco-2 traitée à l'H₂O₂ a été évaluée. Ces travaux combinés ont permis de sélectionner 6 souches qui ont ensuite été testées *in vivo* sur un modèle murin. De manière originale, l'utilisation du nématode *Caenorhabditis elegans* est également une approche développée afin d'étudier l'impact *in vivo* de différentes souches bactériennes. L'ingestion de bactéries ou microorganismes permet en effet de montrer l'impact bénéfique sur l'hôte via la longévité du nématode, des corrélations ont même été observées chez la souris (Guantario *et al.*, 2018; Nakagawa *et al.*, 2016).

3.3. La sélection selon les propriétés intrinsèques aux probiotiques

Cette méthodologie de criblage concerne l'étude de caractéristiques fonctionnelles propres aux souches probiotiques. On distingue ainsi la tolérance à la DGI, incluant les conditions gastriques avec une acidité importante, et les conditions intestinales caractérisées par la présence de bile, ainsi que l'adhésion des souches à l'épithélium intestinal (Shewale *et al.*, 2014). L'absence de toxicité est également un critère primordial dans la mise en évidence d'une souche probiotique, cependant cette propriété est peu utilisée pour un criblage, au vu des genres bactériens couramment étudiés et de leur mention GRAS/QPS.

L'adhésion des cellules bactériennes à l'épithélium intestinal est considérée comme un critère majeur pour la sélection de souches probiotiques (Kotzamanidis *et al.*, 2010; Ouwehand & Salminen, 2003). Différentes méthodologies sont utilisées afin d'évaluer le potentiel d'adhésion de souches bactériennes. L'utilisation de cultures cellulaires intestinales est une méthode largement répandue et permet de modéliser *in vitro* les interactions entre les bactéries et l'épithélium intestinal, les cellules Caco-2 et HT-29 MTX sont les plus utilisées dans ce but (Belguesmia *et al.*, 2016; Jose *et al.*, 2017; Sharma & Kanwar, 2017). L'adhésion aux cellules intestinales est un phénomène dépendant de la composition de la paroi bactérienne (Sengupta *et al.*, 2013; Ubbink & Schär-Zammaretti, 2003), au cours de l'adhésion, et notamment au moment de l'approche de la cellule bactérienne à l'épithélium, un effet hydrophobe permet l'attraction de la cellule à la surface intestinale (Burgain *et al.*, 2014). Ainsi une souche possédant une paroi hydrophobe aura un potentiel d'adhésion plus important (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996). L'évaluation de l'hydrophobie pariétale ou encore du potentiel d'auto-agrégation d'une souche bactérienne, sont également des critères utilisés dans la sélection de souches probiotiques (Kotzamanidis *et al.*, 2010; Vinderola *et al.*, 2004). En plus de l'adhésion, la tolérance à la DGI est également un critère d'intérêt pour la sélection d'une souche probiotique. Cette tolérance peut s'évaluer de différentes façons car les cellules bactériennes rencontrent plusieurs conditions potentiellement délétères au cours de leur passage au sein du tube digestif. On retrouve en effet une acidité importante dans l'estomac et la présence de sels biliaires dans l'intestin. Ces critères peuvent être évalués indépendamment (Kaur *et al.*, 2017; Vázquez *et al.*, 2013) ou lors d'une DGI simulée *in vitro* (Belguesmia *et al.*, 2016). Rodríguez *et al.*, (2018) ont même étudié les paramètres de croissance de différentes souches de levures dans les différentes phases de la digestion afin de sélectionner de potentiels probiotiques.

II. Objectifs

L'appauvrissement du microbiote au cours du vieillissement constitue un facteur de risque au développement de nombreuses pathologies, afin de prévenir ce phénomène et pour maintenir les fonctions intestinales, l'utilisation des probiotiques constitue une approche prometteuse et sûre. Ces organismes peuvent en effet influencer différents aspects physiologiques de leur hôte, tels que les fonctions intestinales, immunitaires ou encore nerveuses. Récemment, l'impact des probiotiques sur le métabolisme osseux a également été mis en évidence par des études *in vivo* bien que les mécanismes d'action restent encore inconnus et qu'ils sont probablement le résultat d'interactions complexes entre le probiotique et l'environnement intestinal dans sa globalité (incluant le microbiote, les cellules intestinales et immunitaires).

Dans ce contexte, l'objectif de ce chapitre est la mise en évidence de souches probiotiques au sein de la collection de Mongolie. Pour cela un criblage de la collection a été réalisé selon une étude des propriétés intrinsèques aux probiotiques. L'objectif est également d'évaluer les différents critères probiotiques mis en avant par les autorités. Finalement, dans le cadre de la prévention de l'ostéoporose, les travaux se sont focalisés sur la recherche de souches permettant une modulation de l'absorption intestinale du calcium.

III. Résultats

1. Sélection de souches potentiellement probiotiques

Afin de sélectionner des souches probiotiques, deux paramètres ont été étudiés à partir des 174 souches de la collection de Mongolie. Ainsi, la tolérance à l'acidité et l'hydrophobie pariétale des souches ont servi de critères de sélection pour le criblage.

1.1. Selon la tolérance à l'acidité

La tolérance à l'acidité a été étudiée en évaluant la capacité des souches à survivre après un passage à pH 2 pendant 2 h. Les souches ont été réparties en 4 classes de tolérance allant de la classe 0 (souches non tolérantes), à la classe 3 (souches tolérantes). Parmi les 174 souches de la collection, 85 sont retrouvées dans la classe 0, 29 dans la classe 1, 16 dans la classe 2 et enfin 44 dans la classe 3 (**Tableau, Annexe 1**).

Plus particulièrement, 75 % des souches non tolérantes à l'acidité (classe 0) sont des souches de *L. delbrueckii* indiquant la faible tolérance de cette espèce. A l'inverse, toutes les souches de *L. fermentum* et *L. plantarum* de la collection (soit respectivement 9 et 6 souches) sont réparties dans la classe 3 suggérant une capacité importante à tolérer l'acidité pour ces espèces. Les deux autres espèces prédominantes de la collection *L. helveticus* et *L. kefiranofaciens* sont réparties équitablement entre les classes de tolérance.

1.2. Selon l'hydrophobie pariétale

En mesurant l'affinité des souches pour un hydrocarbure non polaire, l'hydrophobie pariétale des souches de la collection a été déterminée. Cette hydrophobie varie de 0 à 74 % parmi les 174 souches de la collection (**Tableau, Annexe 1**) avec plus de la moitié des souches qui présentent un faible pourcentage d'hydrophobie pariétale inférieur à 10 %.

1.3. Combinaison des critères et sélection des souches

Dans le but d'accroître la pertinence du criblage, les deux critères précédemment étudiés ont été combinés. La **Figure 36** représente les pourcentages d'hydrophobie pariétale obtenus pour les souches de la collection en fonction de leur classe de tolérance à l'acidité. En classe 0, 7 souches présentent un pourcentage d'hydrophobie supérieur à 30 %, il s'agit de 4 souches de *L. delbrueckii* ss. *bulgaricus* (*L. delbrueckii*), des souches de *L. helveticus*, *L. kefiranofaciens* et un *Leuconostoc lactis*. Pour la classe 1, 2 souches de *L. helveticus* et une souche de *L. kefiranofaciens* possèdent un pourcentage d'hydrophobie supérieur à 30 %. En classe 2, seules deux souches possèdent au moins ce même pourcentage, un *L. helveticus* et un *L. kefiranofaciens*. Enfin pour la classe 3, un total de 8 souches possède un pourcentage d'hydrophobie supérieur à 30 % avec 2 souches de *L. kefiranofaciens*, 2 souches de *L. plantarum*, 2 souches de *L. fermentum*, un *L. casei* et un *L. helveticus*.

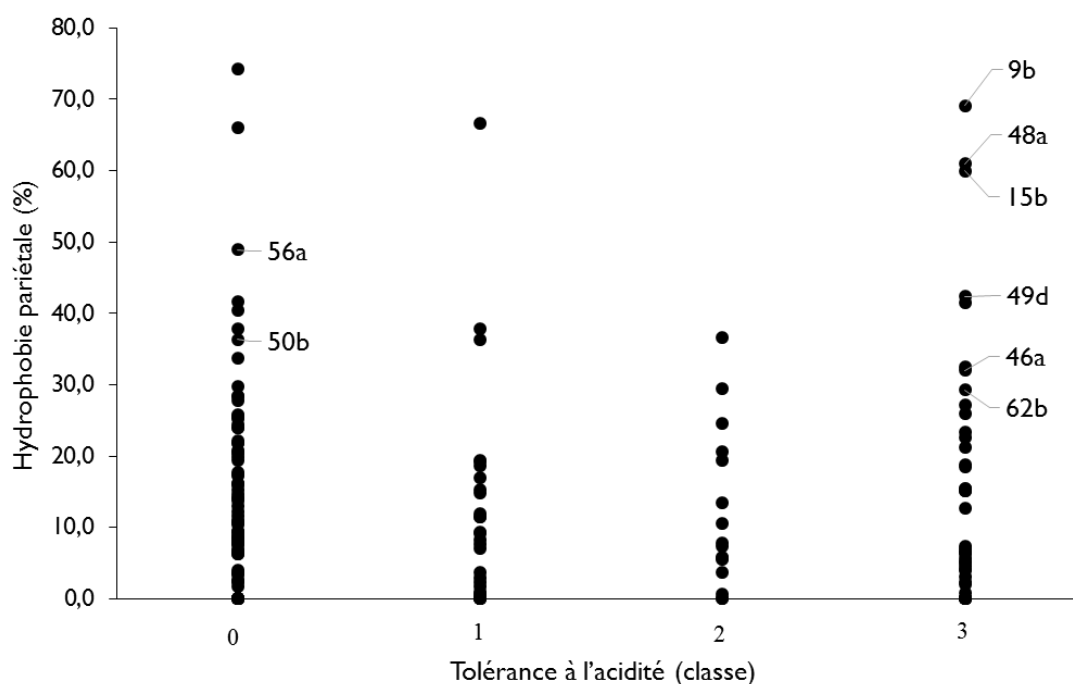


Figure 36 : Pourcentages d'hydrophobie pariétale des souches de la collection en fonction de leur classe de tolérance à l'acidité.

Chaque souche est représentée par un point, les souches étiquetées sur le graphe ont été sélectionnées pour la suite du projet.

La sélection des souches pour la suite du projet a été conduite en combinant les critères étudiés. Ainsi il s'agit de sélectionner des souches ayant un pourcentage d'hydrophobie pariétale supérieur à 30 %, préférentiellement réparties dans la classe 3 de tolérance à l'acidité, et enfin de sélectionner des souches appartenant à des espèces bactériennes différentes. De ce fait, 8 souches ont été sélectionnées pour la suite du projet (**Tableau 10**), les souches *L. casei* 9b, *L. kefiranofaciens* 15b, *L. plantarum* 46a, *L. fermentum* 48a, *L. helveticus* 49d, *L. delbrueckii* 50b, *L. delbrueckii* 56a et enfin *L. fermentum* 62b.

Tableau 10 : Souches sélectionnées pour la suite du projet, sur bases de critères probiotiques.

Espèce	Code/Souche	Hydrophobie pariétale (%)	Classe de tolérance à l'acidité
<i>L. casei</i>	9b	69,14	3
<i>L. kefiranofaciens</i>	15b	60	3
<i>L. plantarum</i>	46a	31,99	3
<i>L. fermentum</i>	48a	60,99	3
<i>L. helveticus</i>	49d	42,37	3
<i>L. delbrueckii</i>	50b	36,32	0
<i>L. delbrueckii</i>	56a	48,93	0
<i>L. fermentum</i>	62b	29,25	3

2. Les souches sélectionnées présentent différentes caractéristiques probiotiques

2.1. Génotypage des souches par REP-PCR

Le génotypage moléculaire permet d'évaluer la variabilité génétique entre les différentes souches sélectionnées. Le dendrogramme (**Figure 37**) généré suite à la technique de REP-PCR présente deux clusters regroupant les souches de *L. delbrueckii* et *L. kefiranofaciens* d'un côté et les souches de *L. fermentum*, *L. casei*, *L. helveticus* et *L. plantarum* de l'autre, ces deux clusters ayant néanmoins 40 % de similarité entre eux. Les deux souches de *L. fermentum* sont identiques à 100 % contrairement aux deux souches de *L. delbrueckii* qui présentent une certaine variabilité entre elles (72 % de similarité). La similarité entre deux espèces différentes est d'environ 68 % au maximum ce qui suggère que la méthode a permis de différencier les souches sélectionnées au moins au niveau de l'espèce.

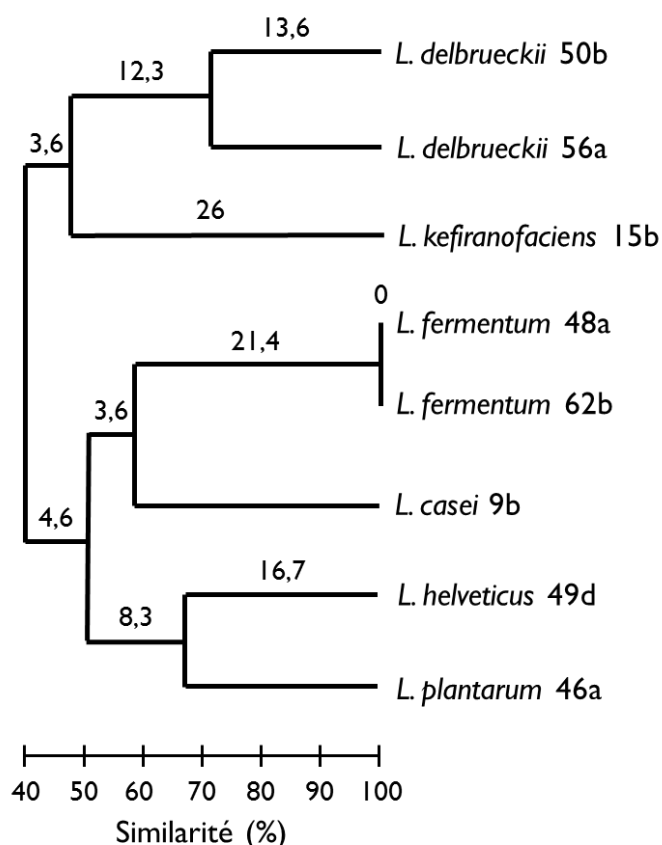


Figure 37 : Dendrogramme généré suite au regroupement des souches en fonction du génotypage par REP-PCR.

Le dendrogramme est construit en utilisant par la méthode UPGMA, la distance entre les souches indiquée sur chaque branche est calculée à partir du coefficient Dice.

2.2. Les souches tolèrent la digestion gastro-intestinale

Malgré le fait que les souches aient déjà été testées pour leur tolérance à l'acidité, un modèle de digestion gastro-intestinale (DGI) *in vitro* a été utilisé pour évaluer la capacité des souches à survivre dans les conditions mimant l'environnement gastro-intestinal. L'avantage ici est de pouvoir simuler successivement les conditions des différentes phases de la DGI ainsi que l'action des enzymes digestives et de la bile. Le nombre initial de cellules bactériennes viables est de 10^9 CFU.mL⁻¹ dans la phase salivaire (**Figure 38**). Au cours de la DGI, la quantité de bactéries diminue plus ou moins selon les souches, la phase gastrique étant la plus délétère pour toutes les souches. A la fin de cette phase, la souche *L. fermentum* 62b présente encore une quantité de $10^{8,86}$ CFU.mL⁻¹ alors que la concentration de la souche *L. delbrueckii* 56a diminue jusqu'à $10^{6,3}$ CFU.mL⁻¹. En fin de DIG, les deux souches les plus sensibles sont le *L. plantarum* 46a et le *L. delbrueckii* 56a avec une perte de plus de 3 points de log (moins de 10^6 CFU.mL⁻¹) par rapport à la concentration de départ. Les autres souches présentent quant à elles une concentration bactérienne entre 10^8 et 10^7 CFU.mL⁻¹ en fin de DIG.

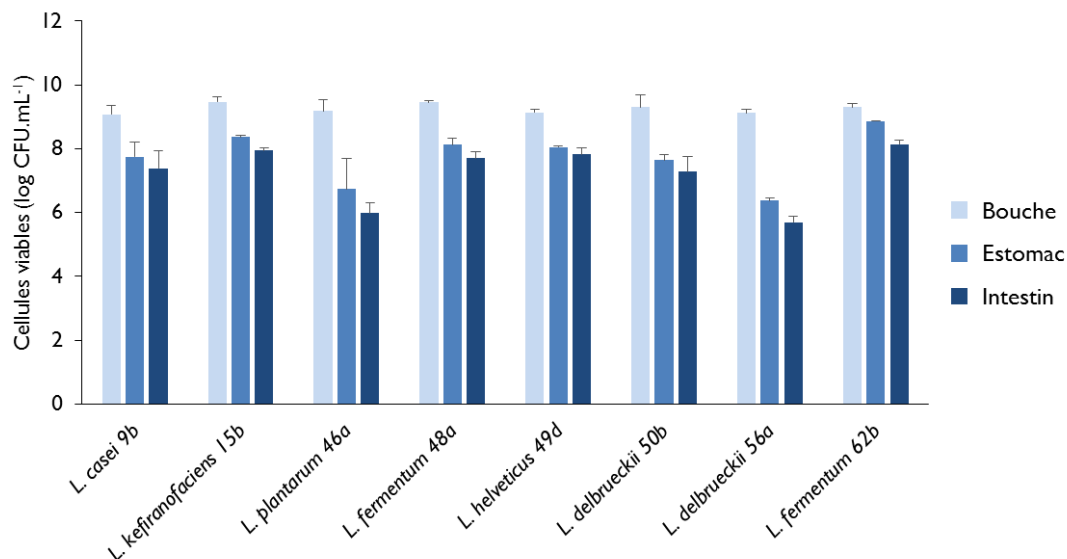


Figure 38 : Concentrations en cellules bactériennes viables dans les 3 différents compartiments de la DGI simulée *in vitro*.

Dans la bouche (bleu clair), l'estomac (bleu) et l'intestin (bleu foncé). Les échantillons ont été prélevés à la fin de chaque étape et le nombre de CFU.mL⁻¹ a été déterminé sur gélose MRS.

2.3. Innocuité des souches bactériennes vis-à-vis des cellules intestinales

La toxicité des souches bactériennes sélectionnées envers les cellules intestinales a été évaluée en utilisant les deux lignées cellulaires épithéliales intestinales humaines Caco-2 et HT-29 MTX comme modèles. Cette caractéristique est mesurée en fonction de la quantité de lactate déshydrogénase (LDH) libérée suite à l'éventuelle lyse des cellules après un contact de 24 h avec les souches (**Figure 39**). Le tampon PBS a été utilisé comme référence pour représenter le niveau basal de LDH libérée. Pour toutes les souches testées, les résultats montrent une absence de toxicité significative envers les deux lignées cellulaires, ce qui suggère que dans ces conditions d'expérience, les souches bactériennes sélectionnées ne sont pas délétères pour les cellules intestinales.

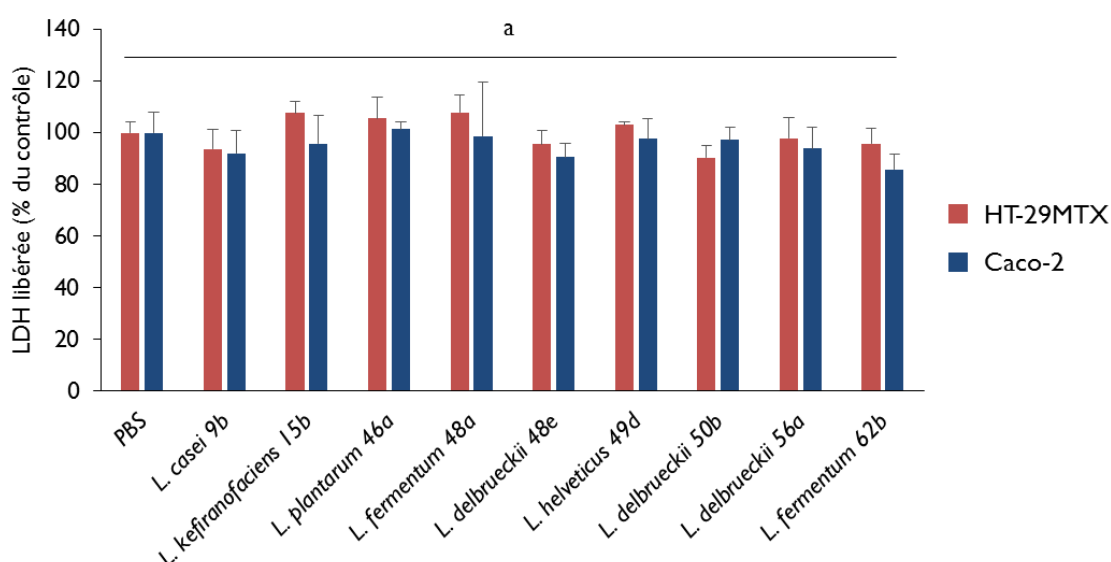


Figure 39 : LDH libérée suite à un contact entre les souches bactériennes et les cellules intestinales Caco-2 et HT-29 MTX.

Caco-2 (en bleu), HT-29 MTX (en rouge). La LDH, quantifiée après 24 h de contact, est exprimée en pourcentage de la condition contrôle (tampon PBS). Les moyennes $\pm$ écart type ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tukey (p value $< 0,05$).

2.4. Auto-agrégation et potentiels d'adhésion aux cellules intestinales

L'auto-agrégation des souches est évaluée par la capacité de sédimentation des souches en suspension. Une augmentation de l'auto-agrégation est observée entre 2,5 et 5 h d'incubation pour toutes les souches étudiées (**Tableau 11**). En effet après 5 h d'incubation, toutes les souches excepté *L. kefiranofaciens* 15b et *L. fermentum* 62b atteignent un pourcentage d'auto-agrégation de plus de 20 %. La souche *L. casei* 9b présente une importante capacité d'auto-agrégation avec environ 95 % de cellules agrégées après seulement 2,5 h d'incubation. Les autres souches présentent des pourcentages compris entre 20 et 70 % à la fin de l'incubation.

Tableau 11 : Pourcentages d'auto-agrégation des cellules bactériennes après 2,5 et 5 h d'incubation dans un tampon PBS.

Les échantillons ont été prélevés sur le dessus de la suspension bactérienne et la DO_{600nm} a été mesurée. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du temps 0 h. Les moyennes $\pm$ écart type ne partageant pas une lettre identique au sein de la même colonne ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tukey (p value $< 0,05$).

Souche	Auto-agrégation (%)	
	2,5 h	5 h
<i>L. casei</i> 9b	95,25 $\pm$ 2,23 ^d	95,23 $\pm$ 0,92 ^d
<i>L. kefiranofaciens</i> 15b	3,53 $\pm$ 5,12 ^a	7,86 $\pm$ 3,57 ^a
<i>L. plantarum</i> 46a	12,74 $\pm$ 3,15 ^{ab}	28,27 $\pm$ 9,7 ^{ac}
<i>L. fermentum</i> 48a	1,97 $\pm$ 6,28 ^a	22,49 $\pm$ 3,19 ^{ab}
<i>L. helveticus</i> 49d	5,83 $\pm$ 5,24 ^a	67,44 $\pm$ 6,99 ^{cd}
<i>L. delbrueckii</i> 50b	33,33 $\pm$ 14,8 ^{bc}	66,67 $\pm$ 17,97 ^{cd}
<i>L. delbrueckii</i> 56a	39,29 $\pm$ 6,97 ^c	46,73 $\pm$ 22,13 ^{ac}
<i>L. fermentum</i> 62b	11,72 $\pm$ 2,22 ^{ab}	18,04 $\pm$ 9,94 ^{ab}

En parallèle, la capacité d'adhésion des souches sélectionnées a été mesurée en utilisant la lignée cellulaire Caco-2. Les pourcentages d'adhésion varient de 0,18 à 4,63 % en fonction des souches (**Tableau 12**), avec 3 souches particulièrement adhérentes aux cellules intestinales qui sont *L. kefiranofaciens* 15b, *L. plantarum* 46a et *L. fermentum* 48a. Les souches *L. casei* 9b, *L. delbrueckii* 50b et 56a sont les moins adhérentes car elles présentent des pourcentages inférieurs à 1 %.

Tableau 12 : Pourcentage de cellules bactériennes adhérentes aux cellules intestinales Caco-2 après 2 h de contact.

Les moyennes $\pm$ écart type ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tukey (p value < 0,05).

Souche	Cellules adhérentes (%)
<i>L. casei</i> 9b	0,95 $\pm$ 0,53 ^{ab}
<i>L. kefiranofaciens</i> 15b	4,11 $\pm$ 2,2 ^c
<i>L. plantarum</i> 46a	4,63 $\pm$ 1,22 ^c
<i>L. fermentum</i> 48a	4,39 $\pm$ 0,33 ^c
<i>L. helveticus</i> 49d	1,48 $\pm$ 0,41 ^{ab}
<i>L. delbrueckii</i> 50b	0,18 $\pm$ 0,13 ^a
<i>L. delbrueckii</i> 56a	0,22 $\pm$ 0,09 ^a
<i>L. fermentum</i> 62b	2,76 $\pm$ 0,81 ^{bc}

En outre, ces résultats sont négativement corrélés avec les pourcentages d'auto-agrégation obtenus précédemment. En effet, la souche *L. casei* 9b présente un pourcentage élevé d'auto-agrégation mais une faible capacité d'adhésion aux cellules intestinales, l'effet inverse est observé pour la souche *L. kefiranofaciens* 15b. Dans cette optique, le coefficient de corrélation Pearson a été calculé entre ces deux jeux de données, il est égal à -0,6 (entre les pourcentages d'adhésion et les pourcentages d'auto-agrégation à 2,5 h) et à -0,75 (entre les pourcentages d'adhésion et les pourcentages d'auto-agrégation à 5 h) ce qui confirme l'existence d'une corrélation négative entre ces deux paramètres.

2.5. Sélection des souches pour la suite du projet

Sur la base de l'évaluation des différents critères probiotiques, deux souches sélectionnées ont été exclues pour la suite du projet. Ainsi, la souche *L. delbrueckii* 56a a été écartée du fait de sa faible résistance à la DGI par rapport à la souche *L. delbrueckii* 50b. De la même manière, la souche *L. fermentum* 62b a également été exclue en raison de son potentiel d'adhésion qui est inférieur à celui de la souche *L. fermentum* 48a. Un total de 6 souches a été conservé pour la suite du projet. Elles appartiennent toutes à des espèces bactériennes différentes, à savoir les souches *L. casei* 9b, *L. kefiranofaciens* 15b, *L. plantarum* 46a, *L. fermentum* 48a, *L. helveticus* 49d et enfin *L. delbrueckii* 50b.

3. Impact des souches sur le métabolisme du calcium et de la vitamine D

L'objectif de cette partie est d'évaluer la capacité probiotique des souches sélectionnées, l'activité biologique ciblée ici est la modulation de l'absorption du calcium au niveau intestinal. Pour cela, les lignées cellulaires Caco-2 et HT-29 MTX ont été utilisées afin d'étudier différents paramètres liés à ce mécanisme.

3.1. Modulation du transport total et de l'incorporation du calcium par les souches

La modulation du transport total du calcium a été déterminée en évaluant sur une durée de 24 h l'augmentation de la concentration en calcium du côté basal d'une monocouche de cellules Caco-2 cultivées sur inserts.

En parallèle, une mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER) a été réalisée pour vérifier l'intégrité de la barrière cellulaire. Les résultats montrent que la TEER augmente au cours du temps d'incubation avec les souches ainsi que dans la condition contrôle (tampon PBS) (**Figure 40A**). Néanmoins, aucune différence significative n'a été constatée entre une incubation avec les différentes souches et le tampon PBS ce qui suggère que les souches testées n'entraînent pas de perturbations dans l'intégrité de la monocouche de cellules Caco-2 durant l'expérience.

Concernant le transport total du calcium (**Figure 40B**), les souches bactériennes ne permettent pas de moduler significativement l'absorption après 7 h de contact par rapport au tampon PBS. Cependant, après 24 h d'incubation, la concentration en calcium diminue dans le compartiment basal dans la condition « contrôle » ainsi qu'en présence de la souche *L. fermentum* 48a, mais une augmentation significative de la quantité de calcium est observée pour 4 autres souches : *L. casei* 9b, *L. kefiranofaciens* 15b, *L. helveticus* 49d et *L. delbrueckii* 50b. De plus au même temps d'incubation, une faible augmentation du taux de calcium est remarquée en présence de la souche *L. plantarum* 46a (p value = 0,052). Ces résultats suggèrent que 5 souches sont capables de moduler positivement le transport total du calcium après 24 h d'incubation avec les cellules Caco-2.

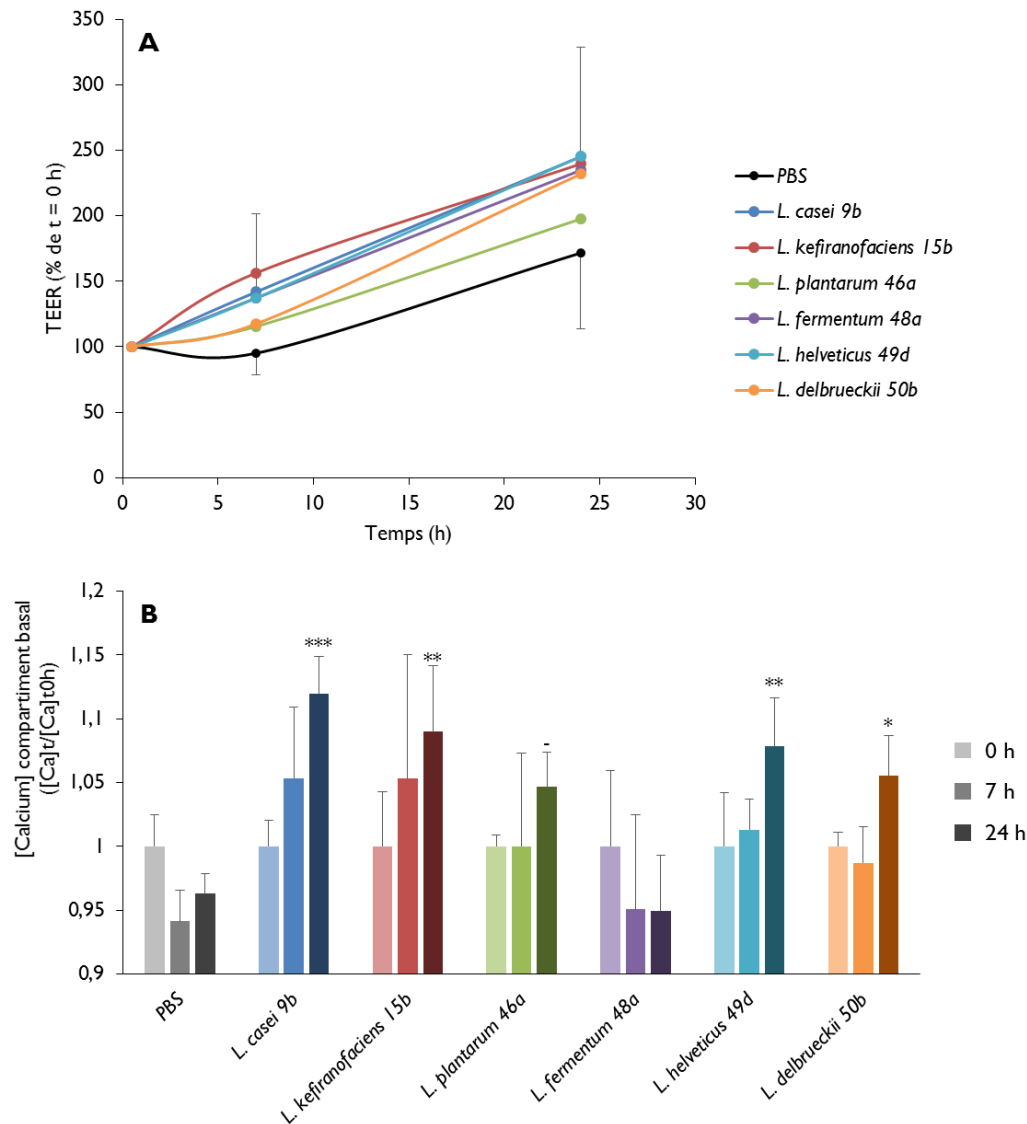


Figure 40 : Evolution de la TEER et de la concentration en calcium dans le compartiment basal d'une monocouche de cellules Caco-2 au cours d'un contact avec les souches bactériennes.

A : Evolution de la TEER au cours d'un contact de 24 h entre les souches bactériennes et les cellules Caco-2. Les valeurs sont exprimées en pourcentage de la valeur de la TEER au temps 0 h. Les moyennes ($\pm$ écart type des courbes PBS et *L. casei* 9b) ne partageant pas une lettre identique au même temps de contact ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tukey (p value $< 0,05$).

B : Evolution de la concentration en calcium dans le compartiment basal d'une monocouche de cellules Caco-2 durant un contact de 24 h avec les souches bactériennes. Les prélèvements sont réalisés dans le compartiment basal de l'insert à 0 (couleur claire), 7 et 24 h (couleur foncée) pour détermination de la concentration en calcium. Les résultats sont exprimés en fonction de la concentration moyenne en calcium obtenue au temps 0 h. Les moyennes $\pm$ écart type ne partageant pas un symbole identique au même temps de contact ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tukey (** p value $< 0,001$, ** p value $< 0,01$, * p value $< 0,05$).

La capacité des souches à moduler l'incorporation du calcium par les cellules intestinales a également été évaluée en utilisant les cellules Caco-2, après une incubation de 24 h avec les différentes souches. L'incorporation d'une sonde fluorescente au sein des cellules intestinales permet de suivre l'évolution du taux de calcium intracellulaire. L'injection d'une quantité importante de CaCl_2 dans le puit entraîne une entrée brutale de calcium dans les cellules conduisant à une augmentation de la fluorescence mesurée, l'augmentation résultante sera dépendante du contact avec les souches réalisé en amont (**Figure 41**). Une incubation avec un tampon PBS entraîne une augmentation du ratio de fluorescence de 1 à 1,3-1,4, en comparaison de ce contrôle, un contact avec les souches *L. casei* 9b, *L. kefiranofaciens* 15b, *L. helveticus* 49d et *L. delbrueckii* 50b n'entraîne pas de modulation significative de l'incorporation du calcium. Cependant, une diminution de l'incorporation du calcium par rapport au contrôle est constatée après incubation avec la souche *L. fermentum* 48a où le ratio de fluorescence augmente seulement de 1 à 1,2-1,3. La souche *L. plantarum* 46a est la seule testée dans cette expérience à induire une augmentation significative de l'incorporation du calcium par rapport au contrôle, le ratio de fluorescence passant en effet de 1 à 1,4-1,5 suggère une capacité de modulation de l'incorporation de calcium par les cellules intestinales.

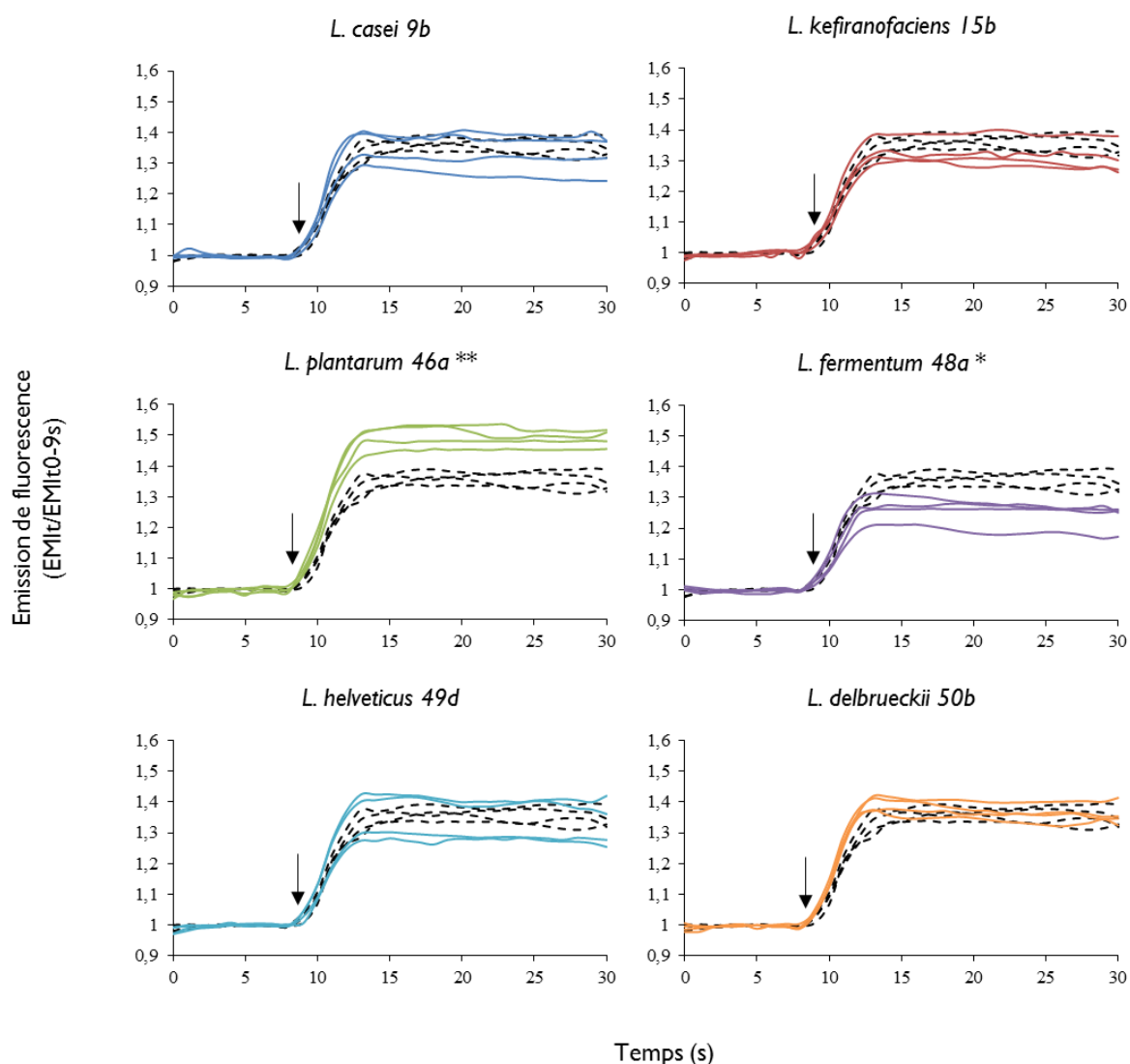


Figure 41 : Evolution de la concentration intracellulaire de calcium chez les cellules Caco-2 après injection de 25 µL d'une solution de CaCl_2 (250 mM).

Après un contact de 24 h entre les cellules Caco-2 et les différentes souches bactériennes, l'émission de fluorescence de la sonde calcium a été suivie pendant 30 secondes avec l'injection de la solution de calcium à 9 secondes (désignée par une flèche). Chaque graphique représente les expériences ($n = 4$) réalisées pour une souche (lignes continues) en comparaison avec la condition contrôle (tampon PBS, lignes pointillées). Les valeurs sont exprimées en ratio de l'émission de fluorescence à l'instant t (EMIt) en fonction de la fluorescence moyenne obtenue entre 0 et 9 secondes de cinétique (EMIt0-9s). Les moyennes obtenues après contact avec les souches bactériennes ont été comparées à la condition contrôle entre 15 et 30 secondes de cinétique par ANOVA à un facteur suivie d'un test de Dunnet, les conditions associées à un symbole ont été considérées comme statistiquement différentes du contrôle (** p value < 0,01, * p value < 0,05).

3.2. Modulation de différents gènes impliqués dans le transport du calcium ou la signalisation de la vitamine D

L'effet des 6 souches sélectionnées sur la modulation de l'expression de différents gènes liés aux métabolismes du calcium et de la vitamine D ainsi qu'aux jonctions serrées a été évalué en utilisant les cellules HT-29 MTX après un contact de 24 h. L'expression du gène (*vdr*) codant pour le récepteur à la vitamine D est significativement augmentée en présence des souches *L. plantarum* 46a et *L. delbrueckii* 50b de 1,8 fois par rapport au tampon PBS (**Figure 42A**). De plus, le traitement par les souches *L. casei* 9b, *L. kefiranofaciens* 15b, *L. plantarum* 46a et *L. helveticus* 49d entraîne une augmentation dans l'expression du gène codant pour le transporteur du calcium (*trpv6*) d'au moins 3 fois supérieure au contrôle (**Figure 42B**). L'expression de gènes codant pour des protéines de la famille des claudines impliquées dans les jonctions serrées a également été étudiée, il s'agit de la claudine-2 (*cld-2*) et de la claudine-4 (*cld-4*). La souche *L. delbrueckii* 50b est la seule souche entraînant une augmentation d'expression 2,8 fois supérieure du gène *cld-2* par rapport au tampon PBS (**Figure 42C**). Cependant, toutes les souches testées sont capables de moduler positivement l'expression de *cld-4* avec des taux d'expression au moins 2 fois supérieurs au contrôle (**Figure 42D**).

En résumé, 4 profils de modulation d'expression des gènes peuvent être distingués. La souche *L. fermentum* 48a permet la modulation du gène *cld-4* uniquement. En présence des souches *L. casei* 9b, *L. kefiranofaciens* 15b et *L. helveticus* 49d, les gènes codant pour la claudine-4 et le transporteur du calcium sont positivement modulés. Le *L. delbrueckii* 50b entraîne une augmentation dans l'expression des gènes codant pour les claudines et pour le récepteur à la vitamine D. Enfin la souche *L. plantarum* 46a module l'expression des gènes *cld-4*, *trpv6* et le *vdr* chez les cellules HT-29 MTX.

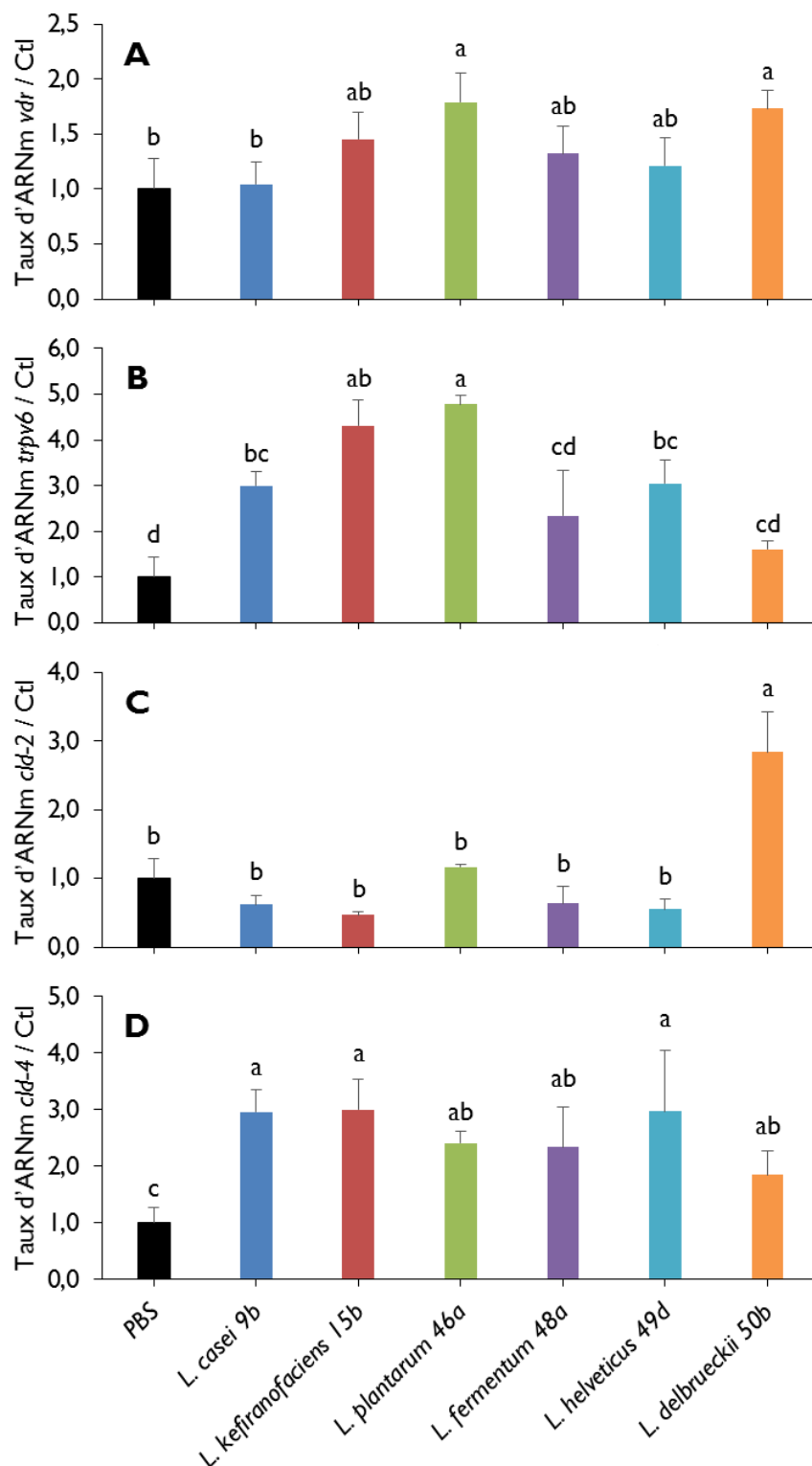


Figure 42 : Taux d'ARNm des 4 gènes étudiés chez les cellules HT-29 MTX après 24 h de contact avec les souches bactériennes.

A : Récepteur à la vitamine D (*vdr*), **B** : Transporteur du calcium (*trpv6*), **C** : Claudine-2 (*cld-2*) et **D** : Claudine-4 (*cld-4*). Les résultats sont exprimés en fonction du contrôle (tampon PBS). Au sein du même graphe, les moyennes $\pm$ écart type ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tukey (p value $< 0,05$).

3.3. Différents impacts sur l'absorption du calcium sont mis en évidence

Les expérimentations réalisées sur les cellules intestinales vis-à-vis de l'absorption du calcium, permettent la distinction de différents profils d'action en fonction des souches étudiées (**Figure 43**). En effet, toutes les souches ont permis de moduler positivement le gène codant pour la claudine-4 chez les cellules HT-29 MTX. Seule la souche *L. fermentum* 48a n'a pas conduit à une amélioration du transport du calcium par la barrière de cellules Caco-2. L'expression du gène codant la claudine-2 n'a été modulée qu'en présence de la souche *L. delbrueckii* 50b. Les souches *L. casei* 9b, *L. kefiranofaciens* 15b, *L. plantarum* 46a et *L. helveticus* 49d ont permis également d'augmenter l'expression du transporteur du calcium (*trpv6*). De plus, la souche *L. plantarum* 46a a permis d'améliorer l'incorporation du calcium par les cellules Caco-2.

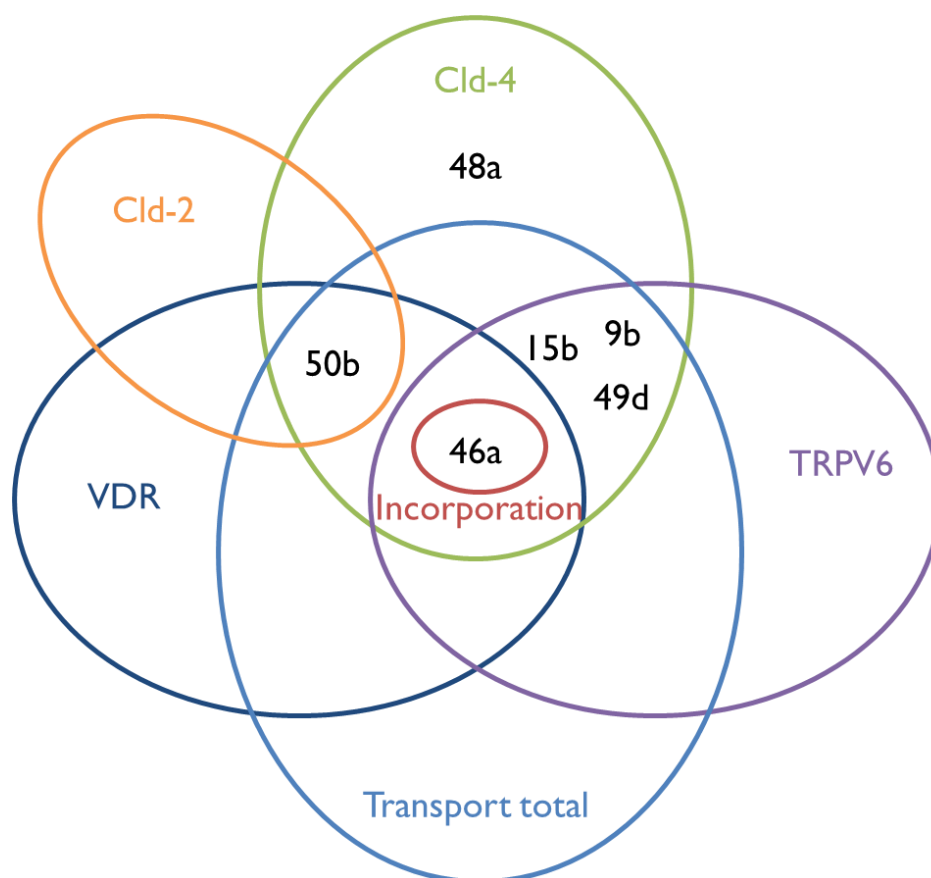


Figure 43 : Diagramme de Venn résumant les expérimentations en liens avec l'absorption du calcium réalisées sur cellules Caco-2 et HT-29 MTX avec les souches bactériennes.

En bleu, amélioration significative sur le transport total du calcium, en rouge sur l'incorporation. En vert, augmentation significative de l'expression du gène codant pour la claudine-4, en orange pour la claudine-2, en violet pour le transporteur du calcium et en bleu foncé pour le récepteur à la vitamine D. Les souches inscrites au sein d'un cercle améliorent l'activité associée.

I.V. Discussion

L'objectif de ce chapitre est la caractérisation de souches contenues dans la collection de Mongolie ayant des activités probiotiques applicables à la prévention de l'ostéoporose. La première étape a consisté à cribler la collection de 174 souches afin d'obtenir un nombre restreint de souches candidates. Dans ce but, deux critères de sélection ont été choisis pour le criblage, l'hydrophobie pariétale et la tolérance à l'acidité.

L'hydrophobie pariétale est un déterminant du potentiel d'adhésion des bactéries aux cellules intestinales et dépend de la composition de la paroi bactérienne (Sengupta *et al.*, 2013). De plus, l'adhésion des souches est considérée comme un critère de sélection primordial pour la mise en évidence de souches probiotiques (Vinderola *et al.*, 2004). En effet dans certains cas, l'adhésion est le mécanisme par lequel les souches impactent positivement les cellules intestinales (Di Cerbo *et al.*, 2016; Sengupta *et al.*, 2013). Dans cette étude, une importante variabilité entre les souches a été observée vis-à-vis de l'hydrophobie pariétale et ce même au sein d'une même espèce. Ce phénomène a déjà été observé et dépend de la composition de la paroi (Angmo *et al.*, 2016). Par utilisation d'un test MATS, il est établi qu'une souche est hydrophobe lorsque le pourcentage d'hydrophobie pariétale est supérieur à 50 %, modérément hydrophobe pour un pourcentage compris entre 20 et 50 % et hydrophile pour un pourcentage inférieur à 20 % (Burgain *et al.*, 2014). Les résultats obtenus mettent en évidence 8 souches ayant des pourcentages d'hydrophobie pariétale supérieurs à 30 % soit des souches hydrophobes ou modérément.

La tolérance à l'acidité des souches bactériennes est un critère permettant d'évaluer la capacité des souches à survivre à la DGI et plus particulièrement aux conditions gastriques où l'acidité élevée et est caractérisée par un pH compris entre 1,5 et 3 (Charteris *et al.*, 1998). L'objectif est d'obtenir des souches capables de résister à ces conditions extrêmes afin d'atteindre un nombre important de cellules bactériennes viables et actives au niveau de l'intestin (Angmo *et al.*, 2016; Lo Curto *et al.*, 2011). La survie des souches bactériennes à pH faible est réalisée par un mécanisme appelé la réponse de tolérance à l'acidité (RTA), ce mécanisme est différent qualitativement et quantitativement selon les espèces et souches de *Lactobacillus* (Sengupta *et al.*, 2013), bien que certaines particularités sont retrouvées. Dans ce projet, toutes les souches de *L. fermentum* et *L. plantarum* testées ont montré une forte tolérance à l'acidité, ce phénomène a déjà été observé par Ramos *et al.* (2013). A l'inverse, la majorité des souches de *L. delbrueckii* testées au cours de ce travail ont présenté une tolérance quasi nulle à l'acidité. L'espèce est en

effet considérée comme ayant une faible résistance intrinsèque à l'acidité (Charteris *et al.*, 1998; Vinderola & Reinheimer, 2003).

Afin d'accroître la pertinence des deux criblages indépendants, les critères d'hydrophobie pariétale et de tolérance à l'acidité ont été combinés dans une même représentation. Ainsi grâce à cette méthode, il est possible de sélectionner des souches présentant à la fois un pourcentage d'hydrophobie élevé et une tolérance à l'acidité importante. La combinaison des critères a permis la sélection de 8 souches pour la suite des expériences, à savoir les souches *L. casei* 9b, *L. kefiranofaciens* 15b, *L. plantarum* 46a, *L. fermentum* 48a, *L. helveticus* 49d, *L. delbrueckii* 50b, *L. delbrueckii* 56a et enfin *L. fermentum* 62b.

Excepté les souches de *L. delbrueckii*, toutes les souches sélectionnées sont tolérantes à l'acidité (classe 3), le choix de conserver les souches non tolérantes a été motivé par le souhait de sélectionner différentes espèces de *Lactobacillus* et ainsi d'accroître la variabilité entre les souches. Au cours de ce projet, la tolérance à l'acidité est un critère défini arbitrairement pour le criblage de la collection néanmoins, la viabilité des cellules bactériennes dans l'intestin n'est pas systématiquement un critère déterminant pour apporter le bénéfice santé. En effet, la viabilité bactérienne dans l'intestin montre plus de résultats bénéfiques mais elle n'est pas toujours requise (Lahtinen, 2012). De plus, la consommation des souches de *L. delbrueckii* peut être réalisée en période postprandiale où le pH de l'estomac est plutôt égal à 3, un taux de survie plus élevé a d'ailleurs été observé par Vinderola & Reinheimer, (2003) entre des souches de *L. delbrueckii* subissant un passage à pH 3 par rapport au passage à pH 2.

Pour la deuxième étape, les souches sélectionnées ont été caractérisées pour différentes propriétés relatives aux probiotiques. Il s'agit ici de poursuivre l'étude du potentiel probiotique de ces souches, à travers l'évaluation de leur capacité d'adhésion aux cellules intestinales et leur absence de toxicité, ainsi que leur tolérance à la DIG.

L'auto-agrégation est la capacité des cellules bactériennes à s'agglomérer entre elles, dans certains cas, cette caractéristique est corrélée avec la capacité d'adhésion aux cellules intestinales (Angmo *et al.*, 2016). Les résultats obtenus par les tests d'auto-agrégation montrent une augmentation de l'agglomération entre les cellules bactériennes au cours de l'incubation, ce phénomène a déjà été observé avec des souches issues de lait de chamelle (Abushelaibi *et al.*, 2017). A l'instar des résultats d'hydrophobie pariétale, une importante variabilité est observée entre les souches. Cependant, 6 souches testées sur 8 montrent une capacité d'auto-agrégation élevée après 5h d'incubation dans un tampon PBS (Kotzamanidis *et al.*, 2010).

L'adhésion des souches aux cellules intestinales a ensuite été évaluée *in vitro* sur cellules Caco-2. La plupart des souches testées présentent des pourcentages d'adhésion élevés de plus de 1 %. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Tuomola & Salminen, (1998) qui ont étudié l'adhésion de différentes souches probiotiques ou starters de fermentation appartenant au genre *Lactobacillus* sur cellules Caco-2. A titre d'exemple, dans cette étude, la souche probiotique Shirota de *L. paracasei* présentait un potentiel d'adhésion de 3,2 %. A l'inverse, certaines souches testées, telles que les souches de *L. delbrueckii* (50b et 56a) ainsi que la souche *L. casei* 9b, ont présenté les plus faibles pourcentages d'adhésion aux cellules intestinales (inférieurs à 1 %). L'adhésion aux cellules intestinales est un phénomène dépendant de la composition de la paroi bactérienne, qui peut varier entre différentes souches de Lactobacilles (Sengupta *et al.*, 2013). Des expérimentations devront être conduites afin de déterminer la nature biochimique de l'adhésion (Dimitrov *et al.*, 2014). De façon intéressante, une corrélation négative a été observée entre les critères d'auto-agrégation des souches et ceux d'adhésion *in vitro*. Cette observation n'est pas cohérente avec celle de Kotzamanidis *et al.*, (2010), pour qui ces deux propriétés bactériennes sont corrélées de façon positive. Néanmoins, dans d'autres études aucune corrélation n'a pu être faite entre agrégation et adhésion, ce qui suggère que l'interaction entre les bactéries et les cellules intestinales est un phénomène plus complexe (García-Cayuela *et al.*, 2014; Ramos *et al.*, 2013).

Les Lactobacilles sont largement reconnus comme des espèces sûres d'un point de vue toxicologique. Leur absence de toxicité vis-à-vis des cellules intestinales est d'ailleurs un fait très établi (Er *et al.*, 2015; Messaoudi *et al.*, 2012). Pour ce projet, cette absence de cytotoxicité a été observée pour toutes les souches à la fois sur les lignées cellulaires Caco-2 et HT-29 MTX.

La tolérance à la DGI est un critère important pour la sélection de souches probiotiques (Shewale *et al.*, 2014), un modèle permettant la simulation séquentielle des 3 premiers compartiments du tractus gastro-intestinal a été utilisé dans cette étude (Belguesmia *et al.*, 2016). Avec une charge bactérienne de départ de 10^9 CFU.mL⁻¹, les souches bactériennes ont montré de bonnes capacités de tolérance à la DIG simulée, atteignant au minimum 10^6 CFU.mL⁻¹ en fin de digestion. Les résultats montrent que la phase gastrique est l'étape la plus délétère pour les bactéries, probablement de par l'action combinée du faible pH et des enzymes gastriques (Belguesmia *et al.*, 2016). Il est difficile de comparer les résultats obtenus dans cette étude avec ceux de la littérature tant les protocoles utilisés et les conditions de DIG simulées sont différents d'une étude à l'autre. De façon générale, les Lactobacilles perdent entre 1 et 3 points de log(CFU.mL⁻¹) à la fin d'une DIG simulée en comparaison avec la charge bactérienne

au début de la digestion (Belguesmia *et al.*, 2016; Fernandez *et al.*, 2003; Pitino *et al.*, 2010) ce qui est cohérent avec les résultats obtenus pour les souches testées.

En se basant sur ces derniers résultats, 6 souches de *Lactobacillus* ont été conservées parmi les 8 pour la suite du projet : les souches *L. casei* 9b, *L. kefiranofaciens* 15b, *L. plantarum* 46a, *L. fermentum* 48a, *L. helveticus* 49d et *L. delbrueckii* 50b. La souche *L. delbrueckii* 56a n'a pas été sélectionnée pour sa faible tolérance à la DGI simulée et la souche *L. fermentum* 62b n'a pas été retenue pour son potentiel d'adhésion plus faible que la souche 48a de la même espèce. Les souches bactériennes sélectionnées ne peuvent être considérées comme probiotiques si le bénéfice santé de ces Lactobacilles n'est pas démontré. Dans ce but, l'activité biologique choisie, en lien avec la prévention de l'ostéoporose, a concerné la modulation de l'absorption du calcium au niveau intestinal par les souches bactériennes.

L'impact des probiotiques sur l'absorption du calcium a été majoritairement démontré par des expérimentations *in vivo* (Areco *et al.*, 2015; Kruger *et al.*, 2009; Parvaneh *et al.*, 2014; Scholz-Ahrens *et al.*, 2016). Pour ce projet, l'effet des souches de *Lactobacillus* sélectionnées sur le transport total du calcium a été étudié *in vitro*, notamment sur le modèle de cellules Caco-2. Ce modèle est en effet considéré comme pertinent pour des études de transport du calcium (Giuliano *et al.*, 1991), ces cellules présentent un phénotype similaire aux entérocytes après différenciation avec la présence d'un récepteur à la vitamine D fonctionnel ainsi que la présence des deux voies d'absorption du calcium, la voie saturable et la non-saturable (Fleet & Wood, 1999).

Les résultats concernant l'étude du transport total de calcium par les cellules Caco-2 ont montré qu'un contact pendant 24 h entre les souches bactériennes et les cellules intestinales n'entraînait aucune modification significative de la TEER et donc de l'intégrité de la membrane de cellules Caco-2. Cela suggère que les souches testées ne perturbent pas l'intégrité de la monocouche de cellules intestinales ce qui valide le modèle utilisé pour l'étude du transport de calcium. Ces résultats sont cohérents avec ceux observés dans la littérature, de façon générale, les Lactobacilles améliorent ou n'impactent pas les valeurs de TEER des cellules Caco-2 en monocouche cultivées sur inserts (Ramos *et al.*, 2013). Au cours de cette expérience, la concentration en calcium dans le compartiment basal a été déterminée pendant le temps de contact. Toutes les souches testées ont engendré une augmentation de la concentration basale en calcium, excepté la souche *L. fermentum* 48a. Ces données suggèrent une amélioration du transport total de calcium par les cellules Caco-2 durant un contact avec certains Lactobacilles. Concernant l'incorporation du calcium par les cellules intestinales, c'est-à-dire le calcium

passant du milieu extracellulaire au cytoplasme, seule la souche *L. plantarum* 46a a permis d'améliorer significativement cette activité après 24 h de contact avec les cellules Caco-2. L'incorporation du calcium par les cellules intestinales est la première étape de la voie saturable de transport de calcium (Pérez *et al.*, 2008). Des travaux similaires ont été réalisés sur cellules Caco-2 avec une souche de *L. salivarius* (Gilman & Cashman, 2002). Dans un premier temps, il a été observé que la souche n'était pas capable d'améliorer ni le transport ni l'incorporation du calcium par les cellules intestinales après 6 h de contact. Cela est cohérent avec nos données concernant le transport du calcium après 7 h de contact où aucune variation significative n'a été observée. Néanmoins après 24 h de contact, cette souche de *L. salivarius* a permis d'améliorer l'incorporation du calcium par les cellules Caco-2 de façon significative, mais pas le transport total. Un effet similaire a été observé avec la souche *L. plantarum* 46a qui entraîne également une amélioration de l'incorporation ainsi qu'une tendance à l'augmentation du transport total de calcium. Ces données suggèrent un mécanisme similaire induit par les deux souches de *Lactobacillus* sur l'absorption du calcium.

Afin de déterminer par quel mécanisme les souches de *Lactobacillus* testées améliorent l'incorporation et/ou le transport total du calcium, l'expression de 4 gènes en liens avec les métabolismes du calcium et de la vitamine D ou l'intégrité des jonctions serrées, a été étudiée après contact de 24 h entre les souches et les cellules HT-29 MTX. Ce modèle cellulaire, caractérisé par la présence d'une couche de mucus sur les cellules différenciées, a été utilisé afin de reproduire au mieux les interactions entre cellules intestinales et probiotiques. Le temps de contact de 24 h a été choisi pour respecter le temps d'incubation réalisé avec les cellules Caco-2. Parmi les gènes choisis, le récepteur à la vitamine D (VDR) et le transporteur apical du calcium (TRPV6) sont directement impliqués dans la voie saturable et transcellulaire d'absorption du calcium (Bronner, 2003; Wood *et al.*, 2001). La voie paracellulaire du transport n'est pas encore élucidée complètement mais il semble que la claudine-2, présente au niveau des jonctions serrées, joue un rôle de transporteur sélectif du calcium à travers l'épithélium intestinal (Amasheh, 2002; Fujita *et al.*, 2008). La claudine-4 participe également aux jonctions serrées et est impliquée dans la régulation de la perméabilité paracellulaire (Lu *et al.*, 2013). Les résultats de ces expérimentations ont montré différents profils d'action en fonction des souches bactériennes testées. Dans un premier temps, il a été observé que toutes les souches de *Lactobacilles* entraînent une augmentation de l'expression de *cld-4*, ceci montre une amélioration dans l'intégrité de la monocouche de cellules HT-29 MTX (Lechuga & Ivanov,

2017). De plus, ceci est corrélé aux mesures de TEER réalisées pendant le contact sur cellules Caco-2 où aucune perturbation de l'intégrité n'a été observée.

Dans le cas de la souche *L. fermentum* 48a aucune modulation de l'expression des gènes étudiés n'a été constatée, au regard des résultats obtenus avec les cellules Caco-2, la souche n'a par conséquent pas d'impact sur l'absorption intestinale du calcium (**Figure 44**).

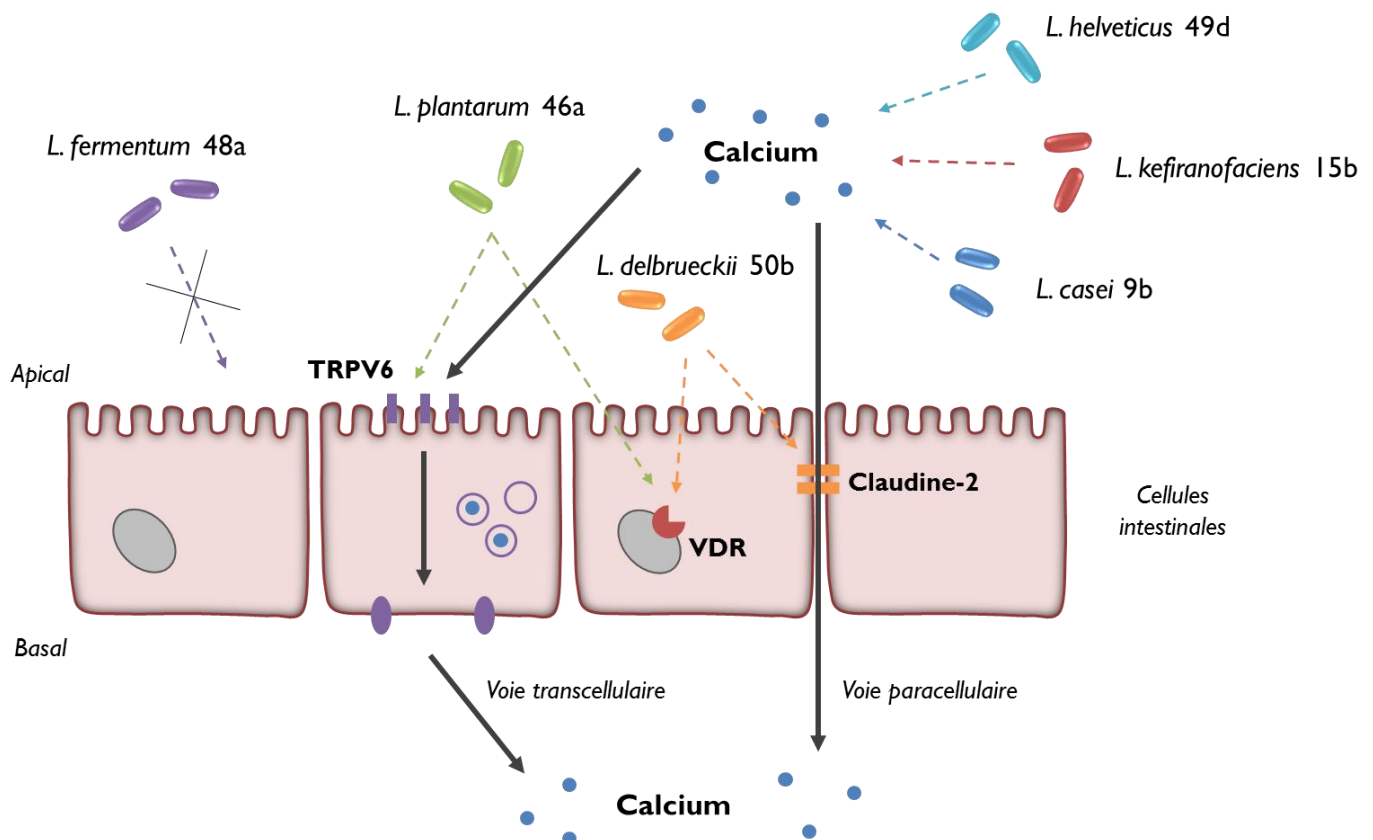


Figure 44 : Mécanismes d'action des souches étudiées vis-à-vis de l'absorption du calcium par les cellules intestinales.

La souche *L. fermentum* 48a n'entraîne aucune modification de l'absorption intestinale du calcium. La souche *L. plantarum* 46a conduit à une modulation du transport actif du calcium (voie transcellulaire) tandis que la souche *L. delbrueckii* 50b stimule sa diffusion passive (voie paracellulaire). Les 3 autres souches (*L. casei* 9b, *L. kefiranofaciens* 15b et *L. helveticus* 49d) modulent le transport total du calcium en agissant probablement sur sa solubilité.

Les souches *L. casei* 9b, *L. kefiranofaciens* 15b et *L. helveticus* 49d ont engendré une modulation modérée de l'expression de *trpv6*, ainsi qu'une amélioration du transport total du calcium. Cependant, des changements d'expression des gènes codant pour le VDR et la claudine-2 n'ont pas été observés. D'après ces résultats, aucune conclusion ne peut être faite quant à la voie de transport modulée par ces souches aboutissant à cette amélioration du transport de calcium. Il est possible que ces souches entraînent de par leur métabolisme, notamment via la production d'acide lactique ou de SCFAs, une diminution du pH apical contribuant à une amélioration de la solubilité du calcium et donc de son absorption (Pérez *et al.*, 2008; Scholz-Ahrens *et al.*, 2007) (**Figure 44**). L'analyse des métabolites produits par ces souches au cours du contact avec les cellules intestinales pourra permettre de vérifier cette hypothèse.

La souche *L. delbrueckii* 50b présente des capacités de modulation du transport total du calcium ainsi que des modulations dans l'expression des gènes codant pour le VDR et la claudine-2 (**Figure 44**). Il est important de noter que certaines claudines ne sont pas seulement impliquées dans l'intégrité des jonctions serrées mais également dans le transport de certains ions ou d'eau comme c'est le cas pour la claudine-2 (Lu *et al.*, 2013). Il a en effet été démontré que les claudines 2 et 12 jouaient un rôle dans la diffusion paracellulaire du calcium sous le contrôle de la vitamine D et de son récepteur (Fujita *et al.*, 2008). L'ensemble des résultats générés avec la souche *L. delbrueckii* 50b montrent donc sa capacité de modulation de la voie paracellulaire de transport intestinal du calcium.

La dernière souche testée *L. plantarum* 46a a permis de moduler positivement les gènes *vdr* et *trpv6* de plus, une tendance à l'amélioration du transport total du calcium a été constatée. Il s'agit également de la seule souche parmi les 6 testées qui a entraîné une augmentation significative de l'incorporation du calcium par les cellules Caco-2. Ces résultats indiquent clairement la capacité de cette souche à agir sur la voie transcellulaire d'absorption du calcium par la modulation de deux protéines impliquées dans cette voie (Pérez *et al.*, 2008) et la capacité d'améliorer l'incorporation du calcium au sein des cellules intestinales (**Figure 44**). Du fait de l'action du transporteur apical du calcium TRPV6, cette voie d'absorption est un transport saturable afin de prévenir des concentrations en calcium intracellulaire délétères pour la cellule (Bronner, 2003; Fleet & Schoch, 2010). Ceci pourrait expliquer pourquoi seule une tendance à l'amélioration du transport total du calcium a été observée pour cette souche et pas une augmentation significative.

Ces travaux présentent de nouvelles données concernant l'impact *in vitro* de souches de Lactobacilles sur l'absorption intestinale du calcium. Cette activité biologique conférée par des probiotiques est en effet peu explorée. Il reste encore à comprendre par quels phénomènes l'interaction entre les cellules intestinales et différentes souches probiotiques (ou le microbiote intestinal en général), permet des modulations différentielles des voies d'absorption du calcium au niveau intestinal. Une fois que les mécanismes d'action des différentes souches auront été caractérisés *in vitro*, une étude *in vivo* permettra de valider les expérimentations réalisées au cours de ce projet. L'avantage sera aussi de pouvoir mesurer l'impact des souches sur le métabolisme osseux. Les modèles de ratte ovariectomisées pourront être utilisés afin d'évaluer ces effets, sur de tels modèles, certaines souches probiotiques ont d'ailleurs déjà montré leurs bénéfices pour la santé osseuse (Kruger *et al.*, 2009; Parvaneh *et al.*, 2015).

Chapitre 4

Approche peptides bioactifs

I. Introduction bibliographique

1. Les peptides bioactifs, des fragments aux effets multiples

1.1. Généralités sur les peptides bioactifs

Les protéines alimentaires sont de plus en plus étudiées pour leur potentiel santé et non plus seulement pour leurs caractéristiques nutritionnelles. L'impact des protéines sur la santé est majoritairement lié à différentes séquences spécifiques (généralement de 2 à 20 acides aminés) encryptées dans leur structure primaire et appelées peptides bioactifs. De telles séquences sont inactives lorsqu'elles sont contenues au sein de la protéine native, mais elles peuvent être libérées suite à l'hydrolyse enzymatique de la protéine et ainsi exercer une activité biologique. La libération de peptides bioactifs est réalisée par différentes hydrolyses enzymatiques : l'hydrolyse des protéines par les enzymes gastro-intestinales lors de la DGI, l'hydrolyse par des enzymes d'origines végétale ou microbienne et enfin la fermentation des protéines (**Figure 45**) (Korhonen, 2009; Korhonen & Pihlanto, 2006).

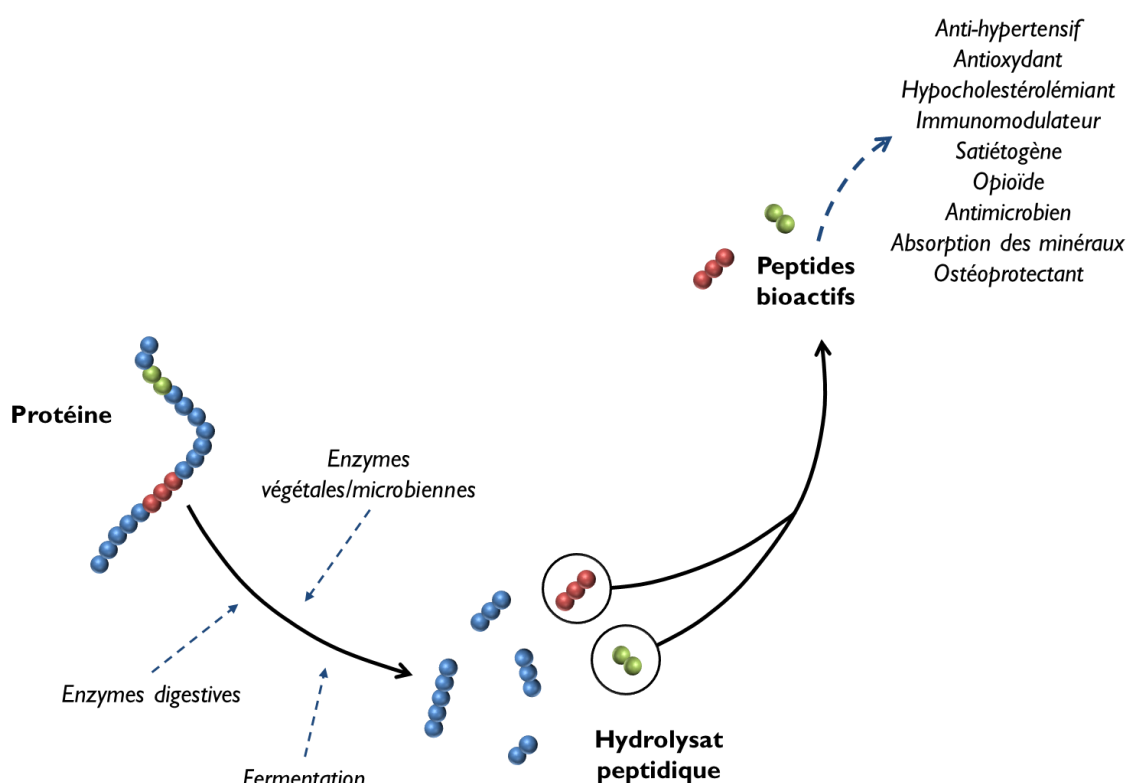


Figure 45 : Production et fonctionnalités des peptides bioactifs.

Les hydrolysats issus des protéines sont produits via l'action des enzymes digestives ou celles d'origines végétale ou microbienne ou encore par fermentation. Au sein d'un hydrolysat, certaines séquences peptidiques peuvent présenter une activité biologique et sont donc appelées peptides bioactifs.

Un peptide est considéré comme bioactif si son action influence positivement des fonctions ou conditions physiologiques aboutissant à une amélioration de la santé (Kitts & Weiler, 2003). Les peptides bioactifs peuvent présenter de nombreux effets sur la santé, leurs propriétés multifonctionnelles ont été démontrées sur les systèmes cardiovasculaire, digestif, immunitaire, osseux ou nerveux. Les activités biologiques des peptides sont nombreuses et variées, pour exemple, plus de 3.600 séquences bioactives sont recensées à ce jour dans la base de données BIOPEP (Minkiewicz *et al.*, 2008) couvrant une trentaine d'activités biologiques différentes (Panchaud *et al.*, 2012) en sachant qu'un même peptide peut conférer plusieurs effets. Les principales actions documentées des peptides bioactifs sont les activités d'inhibition de l'ACE, anti-hypertensive, antimicrobienne, opioïde, antioxydante, d'immunomodulation, hypocholestérolémiant, satiétogène et d'aide à l'absorption des minéraux (Caron *et al.*, 2017; Daliri *et al.*, 2017; Nongonierma & FitzGerald, 2015; Park & Nam, 2015; Sharma *et al.*, 2011).

1.2. Impacts sur le métabolisme

Au vu du nombre d'activités biologiques mis en évidence, les peptides bioactifs peuvent influencer la santé via de nombreux mécanismes. Théoriquement, ils peuvent agir à tous les niveaux du corps humain, sous réserve de conserver leur intégrité et/ou fonction suite à la DGI (Jin *et al.*, 2016), sauf si ils sont spécifiquement produits par cette dernière (Caron *et al.*, 2016), mais également lors du passage de la barrière intestinale (Miner-Williams *et al.*, 2014) ou dans la circulation systémique (Ramachandran *et al.*, 2016). En effet, *in vivo*, les différentes protéases et peptidases présentes au sein du tube digestif et dans la circulation, peuvent hydrolyser ces peptides et ainsi modifier leurs activités voire les inactiver.

Dans cette partie, les différents impacts des peptides bioactifs sur le métabolisme sont présentés. Les recherches portant sur ces peptides montrent de plus en plus leurs potentielles applications dans le traitement ou la prévention de nombreuses pathologies. En sachant que les troubles du métabolisme impactent l'ensemble de la physiologie de l'organisme à différents niveaux, les peptides bioactifs peuvent agir sur plusieurs systèmes et organes du corps humain en particulier l'intestin mais également les systèmes cardiovasculaire, immunitaire, nerveux et osseux (**Figure 46**).

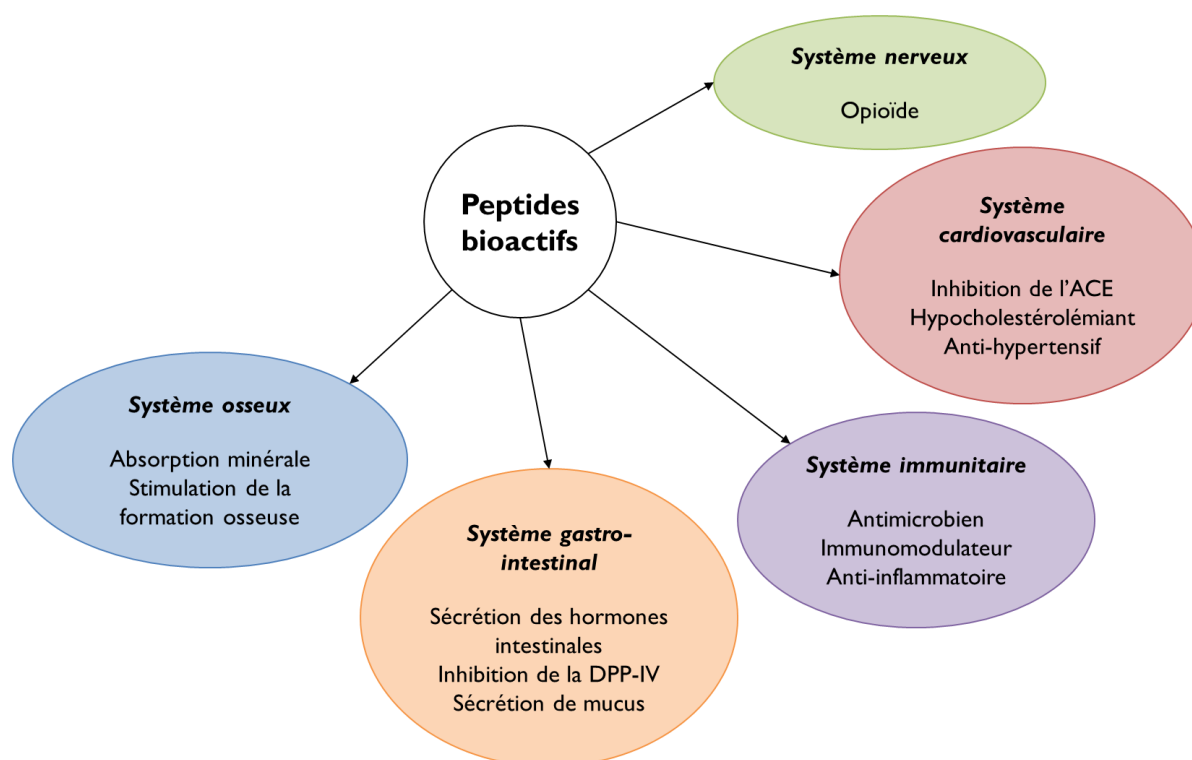


Figure 46 : Effets physiologiques des peptides bioactifs sur différents systèmes.

Les peptides bioactifs peuvent agir sur de nombreux systèmes et métabolismes du corps tels que les systèmes nerveux, cardiovasculaire, immunitaire, gastro-intestinal ou encore osseux.

1.2.1. Effets sur l'homéostasie intestinale

L'intestin est un organe responsable de l'absorption de nutriments, il agit également comme une barrière ainsi que dans la reconnaissance de signaux et la production endogène de molécules actives. Ses nombreuses actions sont régulées par des hormones et des cytokines mais certaines substances contenues dans les aliments peuvent également jouer un rôle dans la modulation des fonctions intestinales. Parmi ces molécules, les peptides bioactifs peuvent affecter l'organisme au niveau gastro-intestinal par différents mécanismes d'action. Certains peptides peuvent exercer une action de protection du mucus intestinal, une modulation de l'absorption des minéraux, un effet anti-inflammatoire, antidiabétique ou encore satiétogène (Hernández-Ledesma *et al.*, 2014).

La couche de mucus a une fonction primordiale dans l'intestin, elle prévient le contact direct entre les cellules intestinales et les microorganismes présents dans la lumière intestinale tout en permettant le passage de différents solutés. Néanmoins dans certaines conditions pathologiques, notamment inflammatoires, la sécrétion de mucus par les cellules intestinales peut être altérée augmentant le risque d'infections ou d'inflammations. Dans ce contexte, certains peptides ou hydrolysats sont capables de stimuler la sécrétion de mucus par les cellules intestinales.

L'exemple le plus connu, sont les β casomorphines dérivées de la caséine β , et plus particulièrement du fragment 60-66 de la protéine. Ces peptides ont démontré leur potentiel stimulateur de la sécrétion de mucines à la fois *in vitro* et *in vivo*, agissant via les récepteurs opioïdes (Claustre *et al.*, 2002; Martínez-Augustin *et al.*, 2014).

Les peptides bioactifs peuvent également impacter la régulation de la prise alimentaire. Ces effets sont médiés par plusieurs facteurs : la stimulation des hormones intestinales, CCK et GLP-1, hormones impliquées dans la signalisation de la satiété après la prise alimentaire, et l'inhibition de la DPP-IV, enzyme inactivant l'action du GLP-1. Ce dernier en qualité d'hormone incrétine est également impliqué dans le métabolisme du glucose (Caron *et al.*, 2017). Pour exemple, la DGI *in vitro* de l'hémoglobine bovine conduit à la libération de peptides bioactifs permettant à la fois de stimuler la sécrétion des hormones intestinales et d'inhiber la DPP-IV. L'hydrolysats généré en phase intestinale de la DGI contient 3 peptides stimulant la sécrétion du GLP-1 par les cellules STC-1 ainsi que le peptide Val-Ala-Ala-Ala (VAAA), mis en évidence pour ses propriétés d'inhibition de la DPP-IV (Caron *et al.*, 2016). Dans ce contexte, l'utilisation de peptides bioactifs inhibiteurs de la DPP-IV, combinée à des analogues du GLP-1 ou des stimulateurs peptidiques de sa sécrétion, est considérée comme un traitement alternatif dans la prévention du diabète de type 2 ou encore de l'obésité (Caron *et al.*, 2017; Godinho *et al.*, 2015; Hernández-Ledesma *et al.*, 2014; Lacroix & Li-Chan, 2012).

1.2.2. Effets sur le système cardiovasculaire et l'inhibition de l'ACE

Une pression artérielle élevée constitue un des facteurs de risque prédominant aux maladies cardiovasculaires. Le système rénine-angiotensine et notamment l'action de l'ACE régulent majoritairement ce phénomène, son inhibition est d'ailleurs considérée depuis longtemps comme la cible thérapeutique pour le traitement de l'hypertension (Sharma *et al.*, 2011). De nombreuses études ont prouvé l'impact des peptides bioactifs sur l'inhibition de l'ACE (Bakr Shori & Salihin Baba, 2015; Jauhiainen & Korpela, 2007; Li *et al.*, 2017a; Solanki *et al.*, 2017), cette classe de peptides inhibant l'ACE est probablement la plus connue parmi l'ensemble des activités biologiques conférées par les peptides bioactifs. Les peptides bioactifs inhibiteurs de l'ACE ont majoritairement été identifiés à partir des protéines laitières et plus particulièrement dans des hydrolysats protéiques obtenus par fermentation du lait comme les peptides Ile-Pro-Pro (IPP) et Val-Pro-Pro (VPP) isolés de laits fermentés par des souches de *L. helveticus* (Wakai & Yanamoto, 2012). Cependant d'autres protéines peuvent être sources d'inhibiteurs de l'ACE, la digestion d'une algue rouge (*Palmaria palmata*) par la papaïne a conduit à la libération d'un

peptide inhibiteur ayant des effets anti-hypertensifs *in vivo* (Fitzgerald *et al.*, 2014), un hydrolysate de sérine (protéine synthétisée par le ver à soie), ou encore d'escargots ont également montré des propriétés d'inhibition de l'ACE (Drevet, 2017; Sun *et al.*, 2017).

Une distinction doit être faite entre peptides bioactifs inhibiteurs de l'ACE et peptides anti-hypertensifs. En effet les peptides démontrant une activité d'inhibition de l'ACE *in vitro* ne présentent pas forcément une activité anti-hypertensive et inversement. Par exemple, l'effet anti-hypertensif des peptides bioactifs peut être dû à des effets anti-inflammatoires ou antioxydants au niveau intestinal (Wu *et al.*, 2017). De plus, l'ensemble des acteurs du système rénine angiotensine étant présents et fonctionnels dans l'intestin, l'inhibition de l'ACE peut être localisée à cet organe et conduire à d'autres impacts physiologiques notamment la protection des fonctions intestinales en particulier l'absorption des minéraux, le transport du glucose ou les inflammations (Fändriks, 2011; Wegman-Ostrosky *et al.*, 2015).

L'accumulation de cholestérol est également un facteur de risque pour le développement des maladies cardiovasculaires. Certains peptides bioactifs sont capables de prévenir son absorption au niveau intestinal par l'inhibition de la formation de micelles de cholestérol diminuant sa solubilité (Daliri *et al.*, 2017; Hernández-Ledesma *et al.*, 2014). Trois peptides isolés d'un hydrolysate de soja ont même montré une capacité d'inhibition de la synthèse de cholestérol *in vitro* sur des cellules de foie (HepG2) (Lammi *et al.*, 2015).

1.2.3. Effets sur le système immunitaire et la modulation des inflammations

Les effets des peptides bioactifs sur l'immunité sont médiés par différents mécanismes tels que l'immunomodulation, la modulation des inflammations ou encore des activités antimicrobiennes. A titre d'exemple, certains peptides sont capables de moduler la prolifération des lymphocytes ou de stimuler l'activité des macrophages (Sharma *et al.*, 2011). Chez la souris, des fractions d'un lait fermenté par *L. helveticus* R389 ont permis d'augmenter le nombre de cellules sécrétant l'immunoglobuline A, impliquée dans la prévention de l'entrée d'antigènes au sein de la muqueuse intestinale (LeBlanc *et al.*, 2002).

Les activités antimicrobiennes et immunomodulatrices des peptides bioactifs sont parfois liées. La modulation du système immunitaire peut en effet conférer une protection contre l'attaque de pathogènes, ainsi de nombreuses séquences peptidiques antimicrobiennes ont été mises en évidence soit par effet direct ou par immunomodulation (Agyei & Danquah, 2012; Alhaj *et al.*, 2018; Daliri *et al.*, 2017). Les peptides issus de l'hydrolyse de la lactoferrine, en particulier le fragment 1-11, ont montré des activités antimicrobiennes contre plusieurs microorganismes

pathogènes lors d'études *in vitro* et *in vivo*. Ces peptides sont d'ailleurs considérés pour différentes applications thérapeutiques (Brouwer *et al.*, 2011).

De nombreux troubles ou pathologies sont liés aux inflammations. A l'instar des effets antimicrobiens, les activités anti-inflammatoires des peptides bioactifs sont médiées par immunomodulation (Hernández-Ledesma *et al.*, 2014). De nombreux peptides bioactifs sont capables d'exercer, à différents niveaux, une action anti-inflammatoire sur l'organisme, généralement par modulation de la sécrétion des médiateurs de l'inflammation. Certaines séquences peptidiques sont capables d'inhiber la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine 6, l'interleukine 8 et le TNF- α ou à l'inverse de stimuler la sécrétion de TGF- β ou d'interleukine 10, des molécules exerçant une action anti-inflammatoires (Majumder *et al.*, 2016). Pour exemple, le peptide Val-Pro-Tyr (VPY) issu du soja, est capable d'inhiber les sécrétions respectives d'interleukine 8 et de TNF- α chez les cellules Caco-2 et THP-1 (Kovacs-Nolan *et al.*, 2012).

1.2.4. Effets sur le système nerveux

Les peptides opioïdes représentent la majorité des peptides bioactifs pouvant exercer une action sur le système nerveux. Ils interagissent avec les récepteurs opioïdes et peuvent ainsi influencer les systèmes nerveux central et périphérique contrôlant des procédés physiologiques tels que l'hypotension, la satiété, le péristaltisme intestinal, la température corporelle, la relaxation, ou le ressenti de la douleur (Caron *et al.*, 2017; Hernández-Ledesma *et al.*, 2014; Mohanty & Mohapatra, 2016).

Les β casomorphines, dérivés du fragment 60-66 de la caséine β , constituent le groupe de peptides opioïdes le plus connu et étudié. Après ingestion de lait ou de produits laitiers, ces peptides ont été retrouvés dans différentes parties du corps comme le tube digestif, le cerveau ainsi que plusieurs fluides biologiques. Cependant, même si leurs interactions avec les récepteurs opioïdes sont démontrées, l'effet biologique des β casomorphines chez l'homme reste encore à prouver (Kamau *et al.*, 2010; Nongonierma & FitzGerald, 2015; Stefanucci *et al.*, 2018). Dérivés de l'hémoglobine bovine, les hémorphines sont également reportés comme peptides bioactifs. Après DGI de l'hémoglobine, certains sont en effet capables de traverser la barrière intestinale et hémato-encéphalique *in vitro*. Après interactions avec les récepteurs opioïdes, ces peptides sont impliqués dans la régulation de la pression sanguine, les fonctions cognitives, le péristaltisme et la perméabilité intestinale, l'homéostasie énergétique ou encore la régulation de l'inflammation (Caron *et al.*, 2017; Domenger *et al.*, 2018).

1.2.5. Effets sur le système osseux

L'impact des peptides bioactifs sur les os est principalement lié à leur capacité à améliorer l'absorption des minéraux au niveau intestinal, le calcium jouant un rôle majeure dans la formation osseuse. Les phosphopeptides de caséines (Casein Phosphopeptides, CPPs) sont l'exemple typique de ces peptides bioactifs, isolés à partir de différents laits. Ces peptides sont capables d'améliorer la biodisponibilité du calcium et donc son absorption par les cellules intestinales. Ils peuvent provenir de la DGI du lait (Hernández-Ledesma *et al.*, 2014) ou encore d'une digestion de caséines par la trypsine (Perego *et al.*, 2015). Les effets des CPPs sur l'absorption intestinale du calcium ont majoritairement été démontrés *in vitro* (Cosentino *et al.*, 2010a, 2010b; Erba *et al.*, 2001; Ferraretto *et al.*, 2001; Perego *et al.*, 2015) et dans une moindre mesure, par des études *in vivo* où, l'action positive des CPPs sur l'absorption du calcium et le métabolisme osseux a également été prouvée (Ma & Yamaguchi, 2000; Parkinson & Cransberg, 2004; Scholz-Ahrens & Schrezenmeir, 2000; Tsuchita *et al.*, 1996). Cependant, même si les effets sont observés, le mécanisme d'action précis des CPPs sur l'absorption du calcium reste encore mal connu. De récentes études montrent un effet des CPPs sur l'incorporation du calcium par les cellules intestinales, impliquant le transporteur du calcium TRPV6 (Colombini *et al.*, 2013; Perego *et al.*, 2013) ce qui suggère une modulation de la voie transcellulaire de l'absorption.

De façon plus anecdotique, certaines études se sont focalisées sur l'impact direct des peptides sur les cellules osseuses. En effet si les peptides résistent au passage à travers la barrière intestinale (Picariello *et al.*, 2013), une action directe sur les cellules osseuses peut être envisagée. Ainsi les CPPs issus de différentes caséines sont capables de stimuler *in vitro* la différenciation des ostéoblastes (Donida *et al.*, 2009; Reddi *et al.*, 2018; Tulipano *et al.*, 2010). De futurs travaux sur les CPPs devraient permettre de caractériser les mécanismes d'actions par lesquels ces peptides bioactifs sont capables de moduler l'absorption du calcium par les cellules intestinales ainsi que leurs effets potentiels sur le métabolisme osseux *in vivo*.

Considérant les nombreux processus physiologiques qui impactent le métabolisme osseux, les peptides bioactifs pourraient agir à d'autres niveaux en sa faveur. En effet une action, même limitée au niveau intestinal, peut avoir des conséquences sur d'autres fonctions de l'organisme, dont le métabolisme osseux. Des activités comme l'inhibition de l'ACE (Chen *et al.*, 2018c), l'inhibition de la DPP-IV (Barchetta *et al.*, 2016), la modulation de l'inflammation (Majumder

et al., 2016) ou encore anti-oxydante (Mada *et al.*, 2017) ont montré un impact sur le métabolisme osseux en particulier dans un contexte pathologique (**Figure 47**).

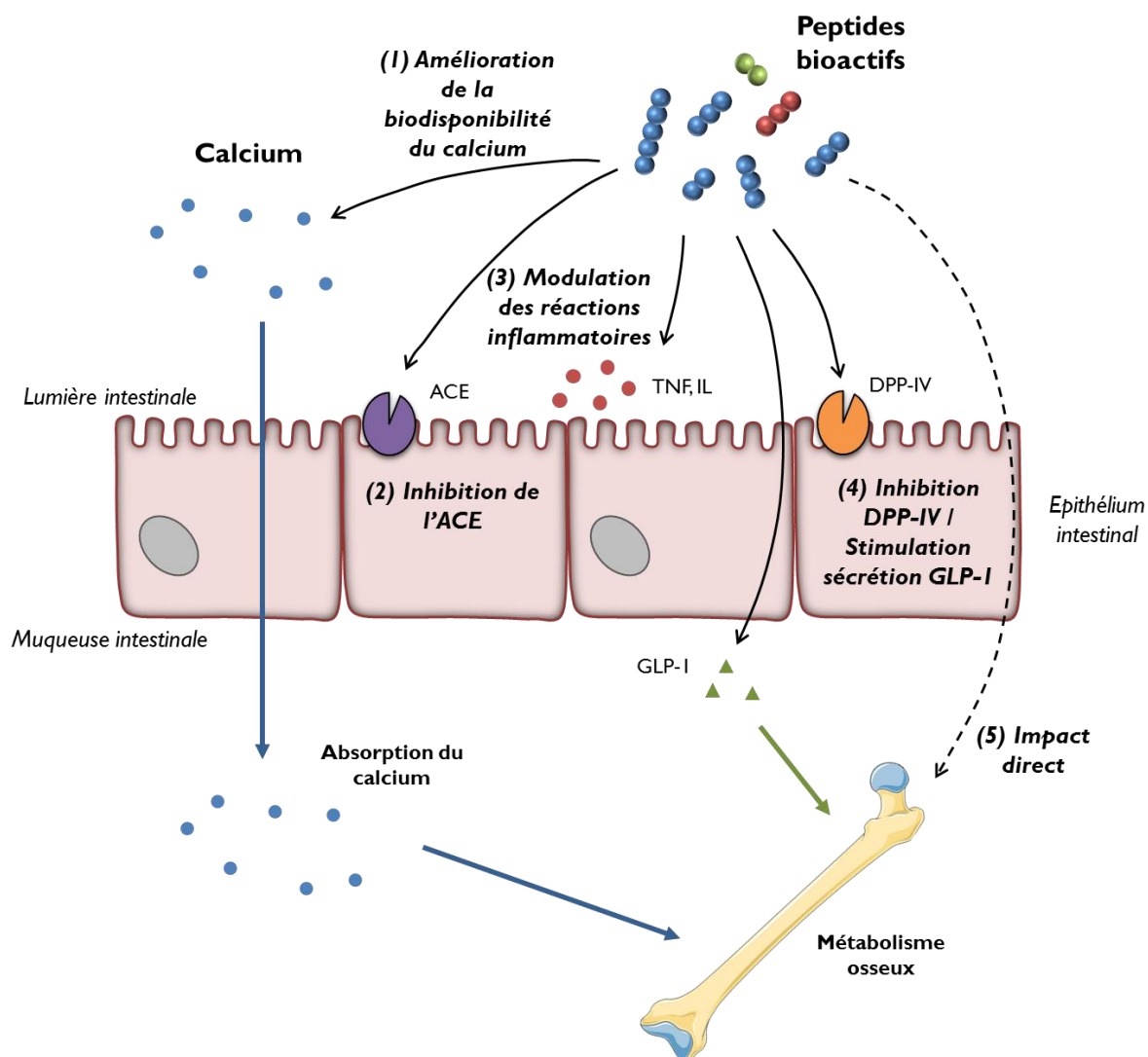


Figure 47 : Impacts des peptides bioactifs sur le métabolisme osseux.

Les peptides bioactifs peuvent impacter le métabolisme osseux par différents mécanismes : l'amélioration de la biodisponibilité du calcium (1), l'inhibition de l'ACE intestinale (2), la modulation de la réponse inflammatoire (3), la stimulation de la sécrétion du GLP-1 (4), et enfin via un impact direct sur le tissu osseux (5).

ACE : Angiotensin Converting Enzyme, DPP-IV : Dipeptidyl Peptidase-IV, GLP-1 : Glucagon Like Peptide-1, TNF : Tumor Necrosis Factor, IL : Interleukine.

2. Stratégies de découverte et d'identification des peptides bioactifs

Différentes stratégies peuvent être employées pour la mise en évidence et l'identification de peptides bioactifs. Actuellement, deux méthodes sont distinguées. La plus ancienne est une approche conventionnelle consistant en la génération aléatoire d'hydrolysats peptidiques suivis d'un criblage de leurs activités pour terminer par l'identification des séquences bioactives au sein de l'hydrolysat. Bien que cette stratégie ait été employée avec beaucoup de succès, elle demeure fastidieuse et les résultats ne sont pas toujours garantis. Dans ce contexte, une approche plus ciblée a été récemment développée, qui consiste à utiliser des outils bio-informatiques permettant la prédiction des séquences peptidiques générées ainsi et de leurs activités (**Figure 48**).

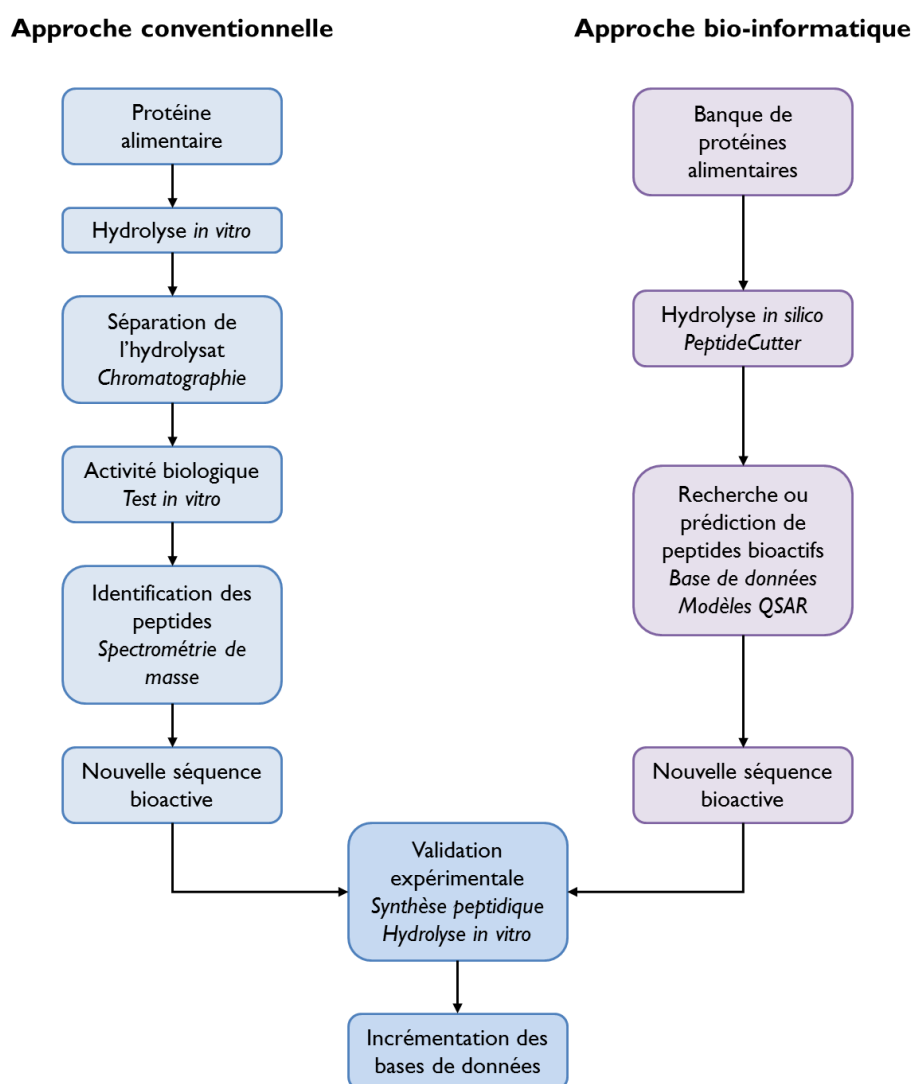


Figure 48 : Stratégies de découverte et d'identification de peptides bioactifs. Sont distinguées l'approche conventionnelle et l'approche bio-informatique. Elles conduisent toutes les deux à l'identification de séquences bioactives.

2.1. Approche conventionnelle

L'approche conventionnelle consiste en une succession d'étape permettant *in fine* la mise en évidence de séquences bioactives. Cette stratégie a été utilisée avec succès dans de nombreuses études, conduisant à l'identification de plusieurs peptides bioactifs issus de différentes protéines (Capriotti *et al.*, 2016; Korhonen, 2009).

La première étape de cette analyse est la génération d'un ou plusieurs hydrolysats peptidiques. Cette étape est conduite par la sélection d'une protéine (ou d'un composé protéique) ainsi que d'une enzyme protéolytique suivie par l'hydrolyse de la protéine sélectionnée dans des conditions définies. Cette première étape est cruciale et conditionne l'ensemble de la stratégie de recherche, la sélection du substrat et de l'enzyme est cependant assez empirique. Cette sélection est en effet réalisée à partir de données issues de la littérature ainsi que sur la base des connaissances de la séquence protéique et des spécificités des enzymes. Les substrats protéiques possibles sont nombreux et sélectionnés selon différents critères, comme la capacité à libérer des peptides bioactifs, mais également la disponibilité ou encore le coût. La sélection des enzymes est conduite selon la voie de production des peptides choisie à savoir, par DGI, par hydrolyse *in vitro* ou par fermentation microbienne. La définition des conditions d'hydrolyse du substrat est également importante car la libération de peptides peut être affectée par différents paramètres tels que le ratio enzyme/substrat, le pH, la température ou le temps d'hydrolyse. Toutes ces sélections sont empiriques et conduisent à une génération relativement aléatoire des hydrolysats peptidiques sans tenir compte d'une potentielle activité biologique.

L'étape suivante est l'évaluation de l'activité biologique des hydrolysats générés. Différents tests *in vitro* existent, basés sur des tests biochimiques ou des tests cellulaires, afin d'évaluer l'impact des hydrolysats sur la santé. La principale limite étant le manque de protocoles standardisés pour l'évaluation *in vitro* des activités (Nongonierma & FitzGerald, 2017).

Après la mise en évidence d'une activité biologique particulière d'un hydrolysats, ce dernier est fractionné, généralement au moyen de techniques chromatographiques. La sélection des fractions d'intérêts est ensuite conduite par la réalisation de nouveaux tests d'activités biologiques. Ceci permet de sélectionner la fraction de l'hydrolysats contenant la ou les séquences peptidiques impliquées dans l'activité. Par la suite, les séquences peptidiques contenues dans la fraction d'intérêt, sont identifiées par spectrométrie de masse (Dallas *et al.*, 2015; Giacometti & Buretić-Tomljanović, 2017).

L'approche conventionnelle est finalement complétée par une validation expérimentale, qui consiste à synthétiser chimiquement des peptides identifiés et à confirmer leur activité biologique *in vitro*. Les nouvelles séquences alors identifiées peuvent incrémenter les bases de données de peptides bioactifs.

2.2. Approche bio-informatique

Du fait de l'expansion des techniques bio-informatiques, une stratégie plus ciblée a été développée depuis quelques années permettant la mise en évidence de nouvelles séquences bioactives. Le développement de logiciels et outils informatiques permet d'améliorer la pertinence de l'approche conventionnelle et la découverte de peptides bioactifs de façon générale (Iwaniak *et al.*, 2015) en particulier lors de l'utilisation d'enzymes purifiées.

La sélection d'un substrat protéique, ainsi que de l'enzyme choisie pour l'hydrolyse, est ainsi assistée par différentes méthodes de prédictions. La sélection du substrat peut être conduite en utilisant les bases de données de peptides bioactifs afin de rechercher les séquences bioactives pour différentes protéines d'intérêts. Un certain nombre de base de données existent plus ou moins en relation avec des activités spécifiques (Giacometti & Buretić-Tomljanović, 2017; Iwaniak *et al.*, 2015), les plus connues étant BIOPEP (Minkiewicz *et al.*, 2008) qui regroupe l'ensemble des peptides bioactifs identifiés et la banque MBPDB (Nielsen *et al.*, 2017) dédiée aux séquences bioactives issues de protéines laitières. De plus, le logiciel PeptideLocator (Mooney *et al.*, 2013) est destiné à la prédiction de séquences bioactives à partir d'une séquence protéique. Parallèlement, le logiciel ToxinPred peut également être utilisé pour la prédiction de peptides toxiques et ainsi éviter la sélection d'une protéine ayant un potentiel cytotoxique élevé (Gupta *et al.*, 2013).

Une hydrolyse *in silico* de la protéine sélectionnée peut être réalisée afin de prédire les séquences peptidiques libérées. Dans ce but, le logiciel PeptideCutter (Gasteiger *et al.*, 2005) peut prédire le potentiel d'une protéine ou séquence protéique à libérer des peptides sous différentes conditions, et ainsi conduire à la sélection d'un couple enzyme/substrat prometteur (Carrasco-Castilla *et al.*, 2012).

Les séquences peptidiques générées suite à l'hydrolyse *in silico* de la protéine d'intérêt sont ensuite soumises à la prédiction toujours *in silico* de leurs activités biologiques. Encore une fois, l'utilisation des bases de données de peptides bioactifs est une approche possible par simple recherche d'homologies avec des séquences bioactives connues (Giacometti & Buretić-Tomljanović, 2017; Iwaniak *et al.*, 2015; Minkiewicz *et al.*, 2008; Nielsen *et al.*, 2017). De

nombreuses études utilisent des modèles QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship) pour la prédiction des activités biologiques de leurs séquences peptidiques (Carrasco-Castilla *et al.*, 2012). Ces modèles analysent la corrélation existante entre les caractéristiques structurales des peptides et leur activité biologique. Ils peuvent également prédire quantitativement l'activité de différents peptides. Le développement d'un modèle QSAR (Iwaniak *et al.*, 2015; Nongonierma & Fitzgerald, 2016) débute par la construction d'une liste de peptides bioactifs comprenant leurs séquences ainsi que des informations quantitatives concernant leurs activités biologiques telles que les valeurs d'IC₅₀ ou EC₅₀ (concentrations minimales inhibitrices ou effectrices de la moitié de l'activité biologique). Les séquences peptidiques sont ensuite décrites par différents descripteurs comme les propriétés physicochimiques des acides aminés, mais également par des échelles de scores, développées dans le but de décrire les acides aminés selon plusieurs paramètres, les z-scores (Hellberg *et al.*, 1987) ou les v-scores (Lin *et al.*, 2008) pour exemples. Une fois que les peptides bioactifs sont décrits, le QSAR est modélisé mathématiquement par des méthodes computationnelles et des analyses statistiques comme l'analyse en composante principale (ACP), la régression linéaire multiple, les réseaux de neurones artificiels, ou la régression par les moindres carrés partiels. Ces analyses permettent de modéliser la relation existante entre la structure d'un peptide et son activité. Le modèle QSAR est finalement validé par une liste de peptides tests n'ayant pas participé au modèle et dont l'activité est connue mais également par synthèse chimique des peptides et vérification expérimentale de l'activité biologique. Une fois validé, le modèle QSAR peut être utilisé afin de prédire l'activité de peptides inconnus. De nombreux modèles QSAR ont été développés, la majorité d'entre eux concerne l'inhibition de l'ACE (Jahangiri *et al.*, 2014) mais également l'inhibition de la DPP-IV (Nongonierma & Fitzgerald, 2016b) ou encore l'inhibition de l' α -glucosidase (Mollica *et al.*, 2018). Ces outils peuvent servir à la mise en évidence d'hydrolysats d'intérêts aux forts potentiels bioactifs ainsi que des séquences peptidiques particulièrement actives. Enfin le *docking* moléculaire est une technique intéressante car elle permet de prédire l'affinité d'un peptide avec la protéine ou le récepteur cible, reflétant ainsi l'activité du peptide (Li-Chan, 2015).

L'approche bio-informatique doit ensuite être validée expérimentalement, en effet l'analyse *in silico* ne peut apporter la preuve biologique de l'activité en comparaison des études *in vitro* ou *in vivo*. L'approche reste prédictive et des différences entre *in silico* et *in vitro* sont à envisager. A titre d'exemple, Nongonierma & FitzGerald, (2016) ont montré que 60 % des peptides libérés

suite à l'hydrolyse *in silico* de l' α -lactalbumine par l'elastase pancréatique étaient réellement identifiables par spectrométrie de masse.

Afin de combler les limites respectives apportées par les deux stratégies de découverte des peptides bioactifs, une approche intégrée a été proposée (Udenigwe, 2014). Elle consiste tout simplement en une combinaison des deux approches à savoir, une approche conventionnelle mais assistée par les différents outils bio-informatiques de prédiction.

3. Applications et limites des peptides bioactifs

Les peptides bioactifs peuvent être utilisés dans le développement de compléments alimentaires mais également dans celui de produits destinés à l'alimentation (**Tableau 13**). Un certain nombre de produits, contenant des peptides bioactifs ou des hydrolysats actifs, sont commercialisés sous différentes allégations santé (Carrasco-Castilla *et al.*, 2012; Korhonen & Pihlanto, 2006). Parmi eux, le produit Evolus® commercialisé par l'entreprise Valio, est un lait fermenté par la souche *L. helveticus* 16H contenant les tripeptides IPP et VPP permettant une réduction de la pression sanguine. Autre exemple, la société HPE Ingredients commercialise toute une gamme de produit à base d'hydrolysats d'escargot aux différentes propriétés.

Les décennies de recherches sur les peptides bioactifs ont conduit à une littérature fournie et bien documentée, l'éventuel développement de produits ou compléments alimentaires à base de peptides bioactifs contribuant à un bénéfice santé peut ainsi être envisagée. Ceci surtout du fait de l'augmentation exponentielle de troubles liés au métabolisme où les peptides bioactifs peuvent montrer leur efficacité. Cependant, il semble que le développement d'approches thérapeutiques ou préventives via les peptides bioactifs soit limité par certains obstacles pouvant impacter l'efficacité, la commercialisation ou encore l'acceptation des peptides bioactifs (Udenigwe, 2014).

Tableau 13 : Exemples de produits et ingrédients commercialisés dont l'activité revendiquée est due à des peptides bioactifs.

Marque	Type de produit	Peptide(s)	Activité biologique revendiquée	Fabricant
BioPURE-GMP	Hydrolysats de petit lait	Fragment (106-169) caséine κ	Prévention des caries dentaires, influence la coagulation sanguine	Davisco, Etats-Unis
BioZate	Hydrolysats de petit lait	Peptides de β -lactoglobuline	Anti-hypertensif	Davisco, Etats-Unis
Calpis®, Calpico®	Lait fermenté	VPP, IPP	Anti-hypertensif	Calpis Co., Japon
Capolac®	Ingrédient	Phosphopeptides de caséines	Aide à l'absorption minérale	Arla Foods Ingredients, Suisse
Cysteine Peptide	Ingrédient Hydrolysats	Peptides de protéines laitières	Favorise le sommeil et apporte de l'énergie	DMV International, Pays Bas
C12	Ingrédient Hydrolysats	Peptides de caséines	Anti-hypertensif	DMV International, Pays Bas
Evolus®	Lait fermenté	VPP, IPP	Anti-hypertensif	Valio Oy, Finlande
GC tooth mousse	Crème à base d'eau	Phosphopeptides de caséines	Prévention des caries dentaires	GC Europe N. V., Belgique
HI-NUTE series	Ingrédient	Peptide de protéines de soja	Prévention de l'obésité et de la fatigue musculaire	Fuji Oil Co. Ltd., Japon
Kotsu Kotsu calcium	Boisson	Phosphopeptides de caséines	Aide à l'absorption minérale	Asahi Soft Drinks Co. Ltd., Japon
Lacprodan® ALPHA-20	Ingrédient	Peptides de l' α -lactalbumine	Réduction des ulcères	Arla Foods Ingredients Group P/S, Danemark
MI paste™, MI paste plus™	Dentifrice	Phosphopeptides de caséines	Prévention des caries dentaires	GC America, Etats-Unis
PeptoPro®	Ingrédient / hydrolysats	Peptides de caséines	Améliore les performances physiques	DSM Food Specialties, Pays Bas
PRODIET F200/Lactium®	Boisson au lait aromatisé	Fragment (91-100) caséine α s1	Réduction des effets du stress	Ingredia, France
Recaldent™	Ingrédient	Phosphopeptides de caséines	Prévention des caries dentaires	Cadbury Enterprises Pte. Ltd., Singapour
Tekkotsu inryou	Boisson	Phosphopeptides de caséines	Aide à l'absorption minérale	Suntory Holdings Limited, Japon
Vasotensin®	Capsule	Peptide de protéines de poisson	Anti-hypertensif	Metagenics Inc, Etats-Unis
Vivinal Alpha	Ingrédient Hydrolysats	Peptides de petit lait	Aide à la relaxation et au sommeil	Borculo Domo Ingredients, Pays Bas

Les hydrolysats peptidiques sont connus pour leur goût souvent amer, le goût étant un critère crucial pour le consommateur car l'amertume conférée par les peptides peut constituer un frein à leur consommation. Les peptides composés d'acides aminés hydrophobes sont particulièrement impliqués dans le goût amer de l'hydrolysat ou du produit et sont surtout retrouvés dans les hydrolysats de protéines laitières (Hafeez *et al.*, 2014). Néanmoins, certaines stratégies existent afin d'atténuer l'amertume finale des hydrolysats peptidiques comme l'encapsulation par les maltodextrines ou cyclodextrines ou les traitements enzymatiques par des exopeptidases (Li-Chan, 2015), le risque dans l'utilisation de ces procédés étant l'altération de l'activité biologique des peptides. La production de peptides par fermentation est également une approche à considérer pour prévenir l'apparition de l'amertume. Certaines souches de *Lactobacilles* sont en effet capables d'éviter la production ou d'hydrolyser les peptides amers (Broadbent *et al.*, 2011; Hou *et al.*, 2015).

Un autre frein au développement et à la commercialisation des peptides bioactifs est le manque de preuves cliniques de leur efficacité sur la santé. Malgré le nombre croissant d'études démontrant l'impact des peptides bioactifs sur la santé que ce soit *in vitro* ou lors d'études animales, des études cliniques manquent afin de prouver leurs impacts bénéfiques sur la santé (Udenigwe, 2014). En particulier, le destin des peptides bioactifs suite à leur consommation par l'homme est peu documenté (Nongonierma & FitzGerald, 2017). Comme décrit précédemment pour présenter une activité biologique, les peptides doivent conserver leur structure et leur intégrité suite à la DGI, au passage de la barrière intestinale ou encore aux peptidases présentes dans la circulation systémique (Li-Chan, 2015; Miner-Williams *et al.*, 2014; Picariello *et al.*, 2013). Les enzymes protéolytiques présentes chez l'homme peuvent ainsi rapidement dégrader les peptides bioactifs après consommation et les rendre inefficaces. Ce manque de données sur le destin ou l'efficacité de peptides bioactifs *in vivo* peut freiner leur développement et leur commercialisation. A titre d'exemple, le lien de cause à effet entre la consommation des tripeptides IPP et VPP dans des laits fermentés par des souches de *L. helveticus* et le maintien d'une pression artérielle normale, a été rejeté par l'EFSA malgré les 70 publications scientifiques relatant d'études cliniques sur ces peptides qui ont été fournies au comité d'experts (EFSA, 2009).

La production des peptides bioactifs à échelle industrielle fait également l'objet de limitations perturbant leur commercialisation. Il y a en effet un manque de procédés de production viables industriellement. Cela est majoritairement dû aux coûts élevés des enzymes nécessaires à l'hydrolyse ainsi qu'à certaines techniques de purification comme la chromatographie (Agyei

et al., 2016; Daliri *et al.*, 2017; Gnasegaran *et al.*, 2017). Cependant certaines études se concentrent sur ces problématiques en réalisant des hydrolyses enzymatiques dans des bioréacteurs à membrane, qui permettent simultanément une production et une séparation des peptides (Wu *et al.*, 2013). De futurs travaux permettront le développement de procédés de production performants et économiques.

En outre, l'utilisation des microorganismes, et en particulier de bactéries lactiques, constitue une approche moins coûteuse en comparaison à l'utilisation d'enzymes purifiées. La voie fermentaire de production de peptides bioactifs a été mise de côté au profit de l'hydrolyse *in vitro* du fait de la faible quantité de peptides produite par les bactéries. Néanmoins, depuis quelques années, les produits fermentés regagnent en popularité suite à la mise en évidence de nombreux peptides bioactifs issus de la fermentation (Korhonen, 2009; Marco *et al.*, 2017). Les organismes les plus étudiés pour la production de peptides bioactifs font partie du genre *Lactobacillus* (Elfahri *et al.*, 2014; Hafeez *et al.*, 2014; Wakai & Yanamoto, 2012).

4. Le système protéolytique des Lactobacilles : producteur d'une grande variété de peptides

Les Lactobacilles peuvent conduire à la production d'une large diversité de peptides, ceci grâce à leur système protéolytique particulier mais également à leurs divergences en termes de bagages protéolytiques. Ces bactéries se distinguent également par l'hétérogénéité des substrats qu'elles peuvent hydrolyser pour la production de peptides.

4.1. Description du système protéolytique

Les espèces du genre *Lactobacillus* sont auxotrophes pour de nombreux acides aminés, c'est pourquoi une source d'azote externe est requise pour leur croissance en particulier dans le lait où la concentration en acides aminés est faible. Pour subvenir à leur nutrition azotée, ces espèces possèdent un système protéolytique permettant d'hydrolyser les protéines présentes dans leur environnement et ainsi fournir les acides aminés requis (**Figure 49**).

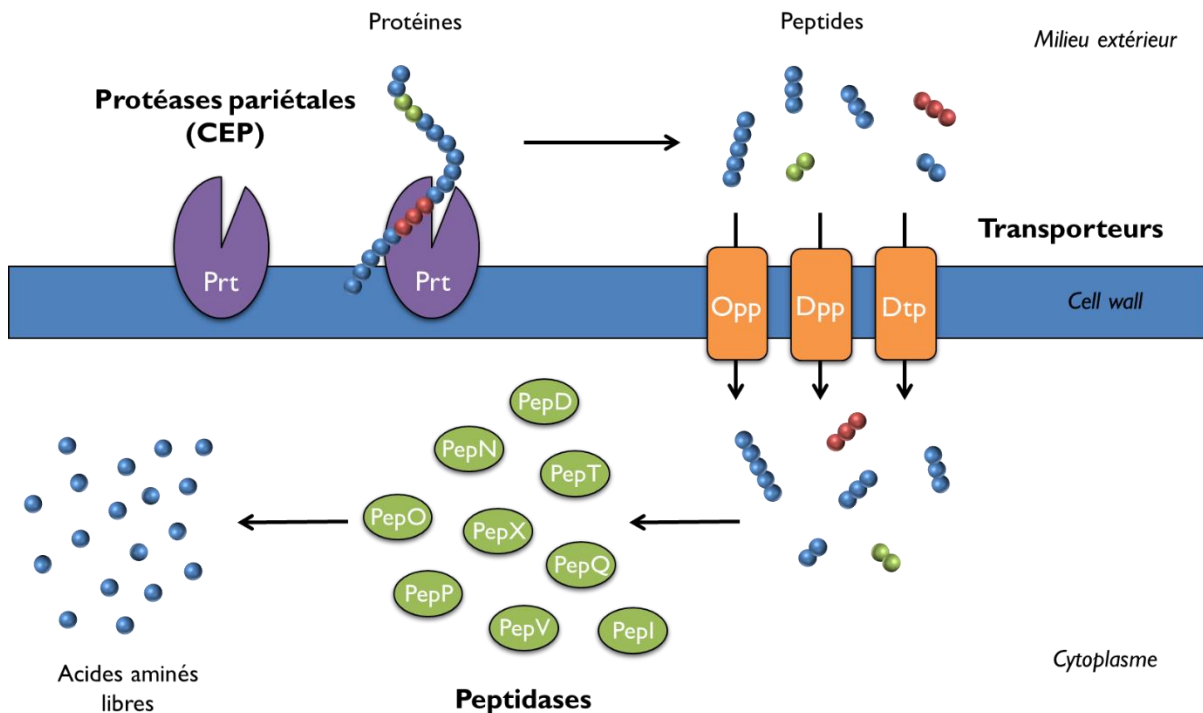


Figure 49 : Le système protéolytique chez les Lactobacilles.

L'hydrolyse des protéines est initiée par les CEP puis les peptides résultants sont incorporés dans la cellule bactérienne où ils seront transformés en acides aminés par différentes peptidases.

CEP : Cell Envelope Proteinase, Opp : Oligopeptide Permease, Dtp : Ion-Linked Transporter for Di and Tripeptides, Dpp : ABC Transporter. Pep : Peptidase.

Ce système est composé de 3 composantes, l'hydrolyse des protéines est initiée par des protéases pariétales (Cell Envelope Proteinase, CEPs) qui vont cliver les protéines en différents peptides possédant de 4 à 30 résidus d'acides aminés dans le milieu extracellulaire. Les peptides résultants seront par la suite transportés au sein de la cellule bactérienne par différents transporteurs à savoir, une perméase à oligopeptides (Oligopeptide Permease, Opp), un transporteur des di et tripeptides (Ion-Linked Transporter for Di and Tripeptides, Dpp) et un transporteur ABC pour les peptides contenant de 2 à 9 résidus d'acides aminés (ABC Transporter, Dpp). Enfin les peptides internalisés seront dégradés en acides aminés par l'action de différentes peptidases telles que des endopeptidases (PepO, PepF, PepE, PepG), des aminopeptidases (PepN, PepC, PepS, PepA, PepL), des tripeptidases (PepT), des dipeptidases (PepD, PepV) et enfin des peptidases proline spécifiques (PepO, PepL, PepR, PepX, PepP). Le système protéolytique des Lactobacilles a été largement revu (Griffiths & Tellez, 2013; Sadat-Mekmene *et al.*, 2011a; Savijoki *et al.*, 2006). Ce système est régulé en fonction de la concentration extracellulaire en peptides et en acides aminés, le système étant réprimé lorsque la concentration en peptides augmente (Hébert *et al.*, 2002). Récemment, Brown *et al.*, (2017) ont mis en évidence l'implication du facteur YebC comme répresseur de la transcription des

gènes codants pour les acteurs du système protéolytique lors de la croissance de la souche *L. delbrueckii* ss *lactis* CRL 581 en présence d'une forte concentration en peptides.

La protéolyse réalisée par les Lactobacilles entraîne des modifications dans les propriétés organoleptiques des produits fermentés. De plus, le système protéolytique peut libérer un certain nombre de peptides bioactifs par hydrolyse des protéines. Les CEPs sont majoritairement responsables de ces changements. Elles sont essentielles pour la croissance bactérienne dans le lait ce qui a été démontré par des expérimentations de délétion de gènes (Courtin *et al.*, 2002). Les CEPs sont des protéases à sérine appartenant à la famille des subtilisines qui sont synthétisées sous forme de pré-protéines constituées d'approximativement 2.000 résidus d'acides aminés et comprenant 7 domaines fonctionnels (**Figure 50**).

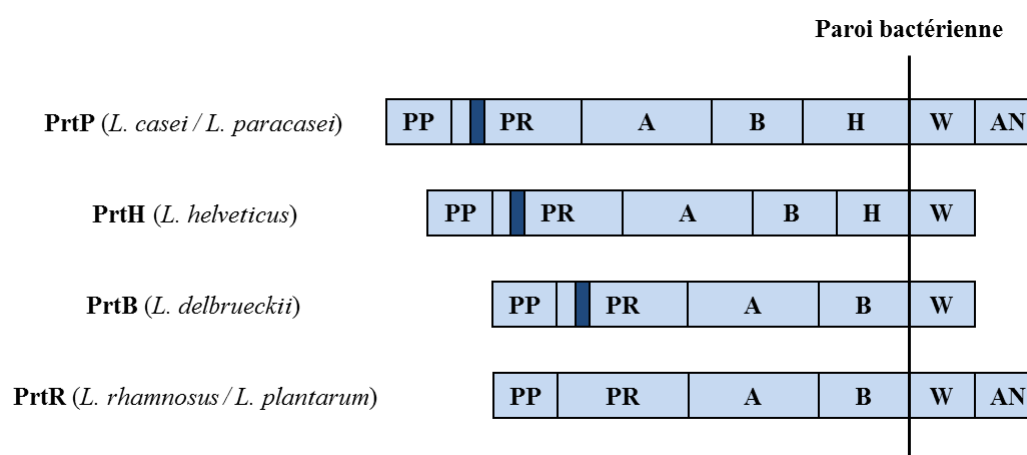


Figure 50 : Organisation structurale de différentes CEPs chez les Lactobacilles.

PP : pro-domaine, PR : domaine catalytique, domaine A, domaine B, H : domaine hélice, AN : domaine d'ancrage et I : domaine d'insertion (en foncé).

En débutant par la partie N terminale les CEPs présentent : un pro-domaine (PP), un domaine catalytique (PR), un domaine d'insertion (I) probablement impliqué dans les spécificités vis-à-vis du substrat, un domaine A dont la fonction est inconnue, un domaine B probablement impliquée dans la stabilisation de l'enzyme, un domaine hélice (H) permettant de maintenir la protéine à l'extérieur de la cellule et un domaine hydrophile (W) servant de domaine d'attachement à la paroi bactérienne (Savijoki *et al.*, 2006). Un domaine d'ancrage est également présent en position C terminale de la séquence excepté pour les CEPs des espèces *L. helveticus* et *L. delbrueckii* (Griffiths & Tellez, 2013).

A ce jour, 4 CEPs différentes ont été caractérisées chez les Lactobacilles, appelées PrtB chez *L. delbrueckii* (Hou *et al.*, 2015), PrtP chez *L. casei* et *L. paracasei* (Alcántara *et al.*, 2016; Ikram-ul-Haq & Mukhtar, 2006; Kojic *et al.*, 1991), PrtR chez *L. rhamnosus* et *L. plantarum*

(Vukotić *et al.*, 2016), et enfin PrtH chez *L. helveticus* (Griffiths & Tellez, 2013; Pederson *et al.*, 1999). Cependant, tandis que la plupart des espèces de Lactobacilles possède une unique CEP, la présence de 4 gènes codants pour différentes CEPs a été reportée chez *L. helveticus* (appelées PrtH1, PrtH2, PrtH3 et PrtH4) et la distribution de ces CEPs est souche dépendante (Broadbent *et al.*, 2011; Miyamoto *et al.*, 2015). L'espèce *L. helveticus* est d'ailleurs considérée comme la plus active parmi les Lactobacilles pour la protéolyse et certainement la plus prometteuse pour l'obtention de peptides bioactifs variés (Genay *et al.*, 2009). Son système protéolytique est particulièrement étudié du fait de l'importante utilisation de ces souches dans la fabrication de produits laitiers fermentés, notamment des fromages (Broadbent *et al.*, 2011). Le système protéolytique performant chez *L. helveticus* s'explique par la présence d'un nombre élevé de CEPs différentes en comparaison avec les autres espèces de Lactobacilles (Stefanovic *et al.*, 2017).

4.2. Différentes spécificités des CEPs vis-à-vis de l'hydrolyse des protéines

Il est établi que les CEPs présentent des spécificités extrêmement variées qui impliquent que l'activité protéolytique ou même le profil d'hydrolyse des protéines soient différents d'une souche à l'autre (Jensen *et al.*, 2009). Ceci est probablement dû à de nombreux facteurs tels que les différences dans l'expression des CEPs, des mutations au niveau des gènes codants les CEPs, des différences entre les conditions optimales d'activité enzymatique ou encore dans la méthodologie utilisée afin d'évaluer le profil d'hydrolyse des CEPs (Alcántara *et al.*, 2016; Patel & Hati, 2018; Sadat-Mekmene *et al.*, 2011b). Dans le cas des souches de *L. helveticus*, la diversité génétique des CEPs expliquent également en partie les différences observées vis-à-vis de l'hydrolyse des protéines (Sadat-Mekmene *et al.*, 2011b). Les travaux de Broadbent *et al.*, (2011) ont permis d'estimer la variabilité génétique présente au niveau des CEPs de *L. helveticus*. Parmi 51 souches de *L. helveticus* (utilisées dans les industries laitières et fromagères), 6 souches possèdent les 4 CEPs, 4 souches possèdent 3 CEPs, 21 présentent un couple de CEPs et enfin 20 souches ne présentent qu'une unique CEP, de plus la prédominance de PrtH3 a été reportée. Dans une autre étude, Miyamoto *et al.*, (2015) ont étudié 6 souches de *L. helveticus* isolées en Mongolie et ont reporté des différences au niveau des profils d'hydrolyse des protéines entre ces souches et des souches originaires d'Europe ou d'Amérique du nord. L'explication probable réside dans le fait que ces 6 souches possèdent uniquement la protéase PrtH1. Ces travaux suggèrent que les CEPs sont largement distribuées au sein des souches de *L. helveticus* expliquant l'étendue du potentiel protéolytique de cette espèce comme

il a été démontré sur les protéines laitières (Jensen et al., 2009; L. Sadat-Mekmene et al., 2011b; Sadat-Mekmene et al., 2013).

La spécificité des CEPs a également été étudiée pour d'autres espèces de Lactobacilles. En effet des différences de spécificité vis-à-vis de l'hydrolyse des caséines ont été mises en évidence entre des souches de *L. helveticus* et la souche *L. delbrueckii* ss *lactis* CRL 581 (Hebert et al., 2008). La même observation a été faite par comparaison de 14 souches de *L. delbrueckii* et 8 souches de *L. helveticus* (Oberg et al., 2002). Différents profils d'hydrolyse des protéines ont même été observés au sein de l'espèce *L. delbrueckii* (Oberg et al., 2002; Oommen et al., 2002).

L'ensemble des données acquises sur les systèmes protéolytiques des Lactobacilles montrent que ces souches possèdent des spécificités protéolytiques variées et ainsi des capacités importantes à libérer des peptides différents. Des études sont encore néanmoins nécessaires afin d'apprécier la diversité présente au niveau de l'activité enzymatique des CEPs. Récemment, une étude de génomique comparative incluant 213 génomes différents de l'espèce *Lactobacillus* a conduit à la détection de 60 gènes de CEPs différents avec des homologies variant de 100 à 20 %. Cette divergence montre le potentiel des Lactobacilles à libérer de nouveaux peptides (Sun et al., 2015).

4.3. Une large variété possible de substrat de fermentation

Les Lactobacilles peuvent donc être utilisés afin d'hydrolyser un grand nombre de protéines différentes. Premièrement, les protéines laitières ne sont pas homologues en fonction de l'espèce productrice de lait. Les laits issus de vache, chèvre, chamelle ou jument sont autant de sources protéiques différentes. La libération de peptides bioactifs peut donc être dépendante de l'origine particulière d'un lait (Ayyash et al., 2017). Généralement, les souches de Lactobacilles sont utilisées pour la fermentation du lait. La majorité des peptides bioactifs produits par le genre *Lactobacillus* a d'ailleurs été isolée à partir de laits fermentés (Dziuba & Dziuba, 2014). Cependant, certaines espèces de Lactobacilles sont capables d'hydrolyser les protéines issues de différentes sources telles que de poisson (Yang et al., 2016), ou de végétaux (Rizzello et al., 2017; Singh & Vij, 2017). A titre d'exemple, la souche *L. plantarum* 299v est capable de libérer des peptides inhibiteurs de l'ACE par fermentation de graines de pois (Jakubczyk et al., 2013).

5. La production de peptides bioactifs par les Lactobacilles : aspect pratique

Différentes stratégies ont été décrites pour la production de peptides bioactifs à partir des Lactobacilles ou de leurs CEPs. Les souches bactériennes peuvent en effet être utilisées pour la fonctionnalisation d'un aliment par fermentation, les laits fermentés en sont l'exemple typique (Hafeez *et al.*, 2014). Une autre approche consiste à extraire les peptides produits par les cellules bactériennes à partir d'un milieu de fermentation d'origine alimentaire ou non. Une dernière approche concerne l'utilisation des CEPs purifiées ou partiellement afin de produire des peptides par hydrolyse *in vitro* des protéines. Chaque stratégie présente différents avantages et inconvénients (**Tableau 14**), le choix dépend surtout de l'application ciblée (**Tableau 15**).

5.1. Fonctionnalisation d'un produit alimentaire

Cette stratégie est particulièrement applicable pour le développement de produits santé destinés à l'alimentation. En plus de présenter des caractéristiques nutritionnelles élevées (vitamines, acides aminés, polysaccharides), les produits fermentés confèrent des bénéfices santé. Cet effet bénéfique peut être attribué dans certains cas à la libération de peptides bioactifs au cours de la fermentation. De nombreux peptides bioactifs ont été isolés de produits fermentés, présentant des activités variées telles que des effets anti-hypertensifs, immunomodulateurs, hypocholestérolémiants, antioxydants, antimicrobiens, d'aides à l'absorption de minéraux, opioïdes, et ostéoformateurs (Marco *et al.*, 2017). L'utilisation de différentes espèces de *Lactobacillus*, comme starters de fermentation ou non, peut aboutir au développement de nouveaux aliments fonctionnels présentant plusieurs activités biologiques. De plus, les Lactobacilles peuvent diminuer l'allergénicité des protéines présentes dans le produit par hydrolyse de leurs épitopes allergènes. Ce phénomène a été particulièrement démontré pour les protéines du lait hydrolysées par des souches de *L. fermentum* ou *L. delbrueckii* (El-Ghaish *et al.*, 2011; Pescuma *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2013).

De nombreuses études ont montré l'intérêt d'utiliser les Lactobacilles et leurs CEPs pour produire différents produits fermentés dont les qualités ont été améliorées par la libération de peptides bioactifs. La majorité de ces travaux concernent les peptides inhibiteurs de l'ACE probablement dû à la facilité d'utilisation d'un test anti-ACE *in vitro*. Les peptides IPP et VPP, inhibiteurs de l'ACE, sont produits par fermentation du lait par des souches de *L. helveticus*, le produit résultant contenant ces peptides montre des activités anti-hypertensives lors d'études animales et cliniques avec une diminution significative de la pression systolique (Wakai & Yanamoto, 2012). D'autres séquences inhibitrices de l'ACE ont pu être isolées, la séquence

Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-Asn-Gln-Asp a été identifiée dans un lait fermenté par la souche *L. helveticus* 130B4 isolée en Mongolie, montrant le potentiel de cette espèce à libérer de nouveaux inhibiteurs de l'ACE (Shuangquan *et al.*, 2008). De plus, l'utilisation de différentes espèces de *Lactobacillus* peut également conduire à la production et à l'identification de nouveaux peptides inhibiteurs de l'ACE. Cela a été montré pour des souches de *L. casei* (Li *et al.*, 2017a). Ces résultats montrent le potentiel des Lactobacilles à libérer différents peptides bioactifs au cours de la fermentation du lait.

Outre l'inhibition de l'ACE, différentes activités biologiques ont pu être mises en évidence dans des produits fermentés. Un lait fermenté par une souche de *L. helveticus* présente des capacités d'immunomodulation après consommation par des souris. De manière intéressante, cette activité n'a pas été retrouvée si les animaux sont nourris à l'aide d'un lait fermenté par un variant non protéolytique de la même souche (Matar *et al.*, 2001). Des propriétés antioxydantes ont été reportées pour des laits de vache ou de chamelle fermentés par différentes souches de *L. plantarum*, *L. paraplantarum*, *L. kefir*, *L. gasseri* et *L. paracasei* (Soleymanzadeh *et al.*, 2016). Un impact possible d'un fermentat produit par une souche de *L. helveticus* sur l'efficacité du sommeil chez les personnes âgées a été mise en évidence (Yamamura *et al.*, 2009). Par ailleurs, de nombreuses études animales ou cliniques ont montré l'impact positif de laits fermentés sur le métabolisme osseux, probablement à cause de la concentration et de la biodisponibilité élevée du calcium dans ces produits (Rizzoli & Biver, 2017). En effet, un lait fermenté par la souche *L. casei* 393 montre un impact positif sur le métabolisme osseux chez des rates ayant subi une ovariectomie (Kim *et al.*, 2009). Un effet comparable a été observé pour des laits fermentés par des souches de *L. helveticus* après consommation par des rats (Narva *et al.*, 2004a) et même sur le métabolisme du calcium chez les femmes ménopausées (Narva *et al.*, 2004b).

Les Lactobacilles peuvent également être utilisés pour produire différents yaourt ou des produits type yaourts. De nombreuses séquences bioactives ont pu être identifiées à partir de ces produits laitiers présentant des activités d'inhibition de l'ACE, antioxydantes et d'immunomodulation. Il a été montré qu'une consommation élevée de yaourts est associée à un effet antioxydant et une diminution du risque de développement d'un diabète de type 2 (Fardet & Rock, 2017; Hove *et al.*, 2015; Jin *et al.*, 2016; Rutella *et al.*, 2016a). De par leur capacité à hydrolyser différentes protéines, les Lactobacilles sont également utilisés pour produire des aliments fermentés à partir de sources non laitières. Dans ce contexte, différentes souches de *L. plantarum* ont été utilisées pour la fermentation de graines de pois ou de lait de

soja, les produits résultants se distinguant par des propriétés antioxydantes ou d'inhibition de l'ACE (Jakubczyk *et al.*, 2013; Singh & Vij, 2017).

Ces travaux montrent l'intérêt de la fermentation par les Lactobacilles, qui peut conduire au développement d'aliments santé qui pourront être destinés à une consommation directe. Cette stratégie est basée sur la production et la fonctionnalisation simultanée du produit. Ainsi, l'avantage de cette approche est que le produit résultant peut être utilisé directement pour conférer l'effet bénéfique sur la santé sans besoin d'extraction ou de purification des peptides bioactifs contenus dans le produit. Néanmoins, la prudence est requise quant au lien existant entre l'activité du produit et les peptides le composant. En effet de nombreux autres métabolites sont produits par les Lactobacilles au cours de la fermentation tels que le lactate, des vitamines ou des exopolysaccharides. Le bénéfice santé d'un produit peut être impacté par d'autres composés produit par la fermentation (Fardet & Rock, 2017; Marco *et al.*, 2017). De plus, en tant que produit alimentaire, l'étude du comportement du produit au cours de la DGI est nécessaire car les protéases digestives sont présentes au sein du tube digestif afin d'hydrolyser les protéines au cours de la digestion. Ainsi les enzymes digestives vont altérer le profil peptidique du produit fermenté et peuvent modifier son activité *in vivo* (Daliri *et al.*, 2017; Picariello *et al.*, 2010). En conséquence, l'impact de la digestion sur les produits fermentés doit être évalué pour combler la différence entre effets *in vitro* et *in vivo*. Dans le cas des inhibiteurs de l'ACE, la DGI augmente la libération de séquences inhibitrices à partir des produits fermentés puisque les protéines non hydrolysées au cours de la fermentation seront digérées durant la DGI, augmentant ainsi la libération de peptides bioactifs. Ce phénomène a été observé pour les laits fermentés (Hernández-Ledesma *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2016; Matar *et al.*, 1996).

5.2. Extraction des peptides à partir du milieu de fermentation

Cette deuxième stratégie est basée sur l'extraction et la purification des peptides bioactifs à partir de milieux de fermentation. Le produit résultant peut ensuite être destiné à plusieurs applications (alimentaire, pharmaceutique ou cosmétique) puisqu'il constitue un ingrédient fonctionnel ou nutraceutique. Le fermentât est produit par les Lactobacilles comme il a été décrit précédemment, à partir de sources alimentaires ou de coproduits, les peptides sont par la suite isolés du milieu par procédés d'extraction et/ou de purification. L'avantage d'une telle approche est de pouvoir utiliser des protéines issues de sources non alimentaires, en particulier les coproduits d'industries qui peuvent ainsi être valorisés. A titre d'exemple, les Lactobacilles sont utilisés pour valoriser les protéines du petit lait issues de l'industrie fromagère (Ahtesh *et al.*, 2016). Comme les peptides extraits sont en théorie spécifiquement produits par les souches

de Lactobacilles utilisés, les interférences avec d'autres composés vis-à-vis de la bioactivité sont limitées. Le principal inconvénient de cette stratégie est lié à l'extraction et à la purification des peptides, ces techniques sont en effet onéreuses mais néanmoins obligatoires pour des applications pharmaceutiques (Agyei *et al.*, 2016).

De nombreuses études ont employé cette stratégie pour l'identification de peptides bioactifs à partir de différents milieux dans lesquelles différentes méthodes d'extraction ou de purification ont pu être utilisées (Agyei *et al.*, 2016; Korhonen & Pihlanto, 2006). La précipitation sélective est une des méthodes réalisée pour séparer les peptides des protéines. Rapide et peu onéreuse, la méthode est facile à utiliser à grande échelle mais l'addition d'un agent de précipitation nécessite une étape de « nettoyage ». Différents agents de précipitation sont utilisés à savoir, l'acide trichloroacétique (TCA), l'éthanol ou le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Une précipitation acide plus pertinente est d'utiliser le métabolisme des Lactobacilles qui conduit à la production d'acide lactique qui diminue le pH durant la fermentation et entraîne la précipitation des protéines. Dès lors, un extrait soluble dans l'eau (Water Soluble Extract, WSE) est facilement obtenu par centrifugation du fermentât (Ayyash *et al.*, 2017). La précipitation sélective est une méthode largement employée pour la récupération de peptides à partir de milieux de fermentation. Le TCA a été utilisé pour l'obtention d'un hydrolysât peptidique, présentant des activités multifonctionnelles, à partir d'un lait fermenté par *L. plantarum* (Aguilar-Toalá *et al.*, 2017) mais également pour l'isolation de peptides à partir de laits fermentés par différentes espèces de Lactobacilles (*L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. casei* et *L. rhamnosus*). Les hydrolysats résultants présentent des activités d'inhibition de l'ACE ou antioxydantes. L'utilisation du métabolisme bactérien et donc de la diminution du pH au cours de la fermentation est la méthode la plus utilisée certainement en raison du fait que l'ajout d'un agent de précipitation n'est pas nécessaire (Solanki *et al.*, 2017; Taha *et al.*, 2017), ce qui permet de conserver un procédé sur et naturel. Parallèlement, des extraits de fermentation issus de *L. paracasei*, destinés à une étude animale pour le traitement de l'hypertension, ont été préparés à l'aide d'un principe de précipitation différent de la précipitation acide : la précipitation à l'éthanol (Cheng & Pan, 2017).

Les techniques utilisant les membranes d'ultra- ou nano-filtrations sont également utilisées pour l'extraction et la purification des peptides (Coutte *et al.*, 2017). L'addition d'un agent chimique supplémentaire n'est pas nécessaires à la réalisation de ces méthodes, elles sont faciles à utiliser à grande échelle et peuvent être couplées à d'autres procédés. Dans ce contexte, les bioréacteurs à membrane sont particulièrement utilisés afin de concevoir des procédés en continu, où

l'hydrolyse des protéines et leur extraction sont couplées (Hernández-Ledesma *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2013). L'ultrafiltration est couramment utilisée pour la séparation de peptides à partir de laits fermentés ou de suspensions de caséines. Le seuil de filtration varie de 3 à 14 kDa en fonction des peptides ciblés (Aguilar-Toalá *et al.*, 2017; Han *et al.*, 2012; Hayes *et al.*, 2006).

Pour terminer, les méthodes chromatographiques peuvent être également considérées pour la purification et l'identification des peptides, ces méthodes incluent la chromatographie d'exclusion stérique ou la chromatographie échangeuse d'ions. Cette stratégie est hautement sélective, la séparation est très résolutive et ne nécessite pas d'agents additionnels. Elle présente cependant un coût extrêmement élevée notamment dans le cadre d'applications industrielles en agroalimentaire. De plus, la chromatographie conduit à une dilution du produit d'intérêt et les déchets de solvants sont conséquents (Agyei *et al.*, 2016). Néanmoins, il s'agit d'une méthode répandue dans le cadre des recherches en peptidomique. A titre d'exemple, la purification et la préparation de peptides anti-tumoraux a été réalisée par chromatographie d'exclusion stérique de laits fermentés par *L. helveticus* (LeBlanc *et al.*, 2002). Du fait de la résolution importante, ce type de purification est particulièrement utilisé pour l'identification de séquences peptidiques spécifiques impliquées dans la bioactivité observée. L'identification des peptides bioactifs est importante pour prouver l'effet bénéfique lié à ces peptides et est même nécessaire dans le cadre d'applications pharmaceutiques (Georgalaki *et al.*, 2017; Giacometti & Buretić-Tomljanović, 2017; Jin *et al.*, 2016).

Concernant l'hydrolyse des protéines, l'activité protéolytique des Lactobacilles au cours de la fermentation est relativement faible en comparaison à l'utilisation d'enzymes purifiées (Daliri *et al.*, 2017). C'est pourquoi les techniques d'extraction et de purification des peptides sont utilisées afin d'enrichir les peptides présents dans le produit final. A titre d'exemple, un WSE d'un lait fermenté par une souche de *L. delbrueckii* présentant une activité d'inhibition de l'ACE et d'immunomodulation, a été lyophilisé et utilisé en tant que nutraceutique dans des yaourts (Kliche *et al.*, 2017).

L'ajout d'une étape de séparation ou de purification à un procédé de production de peptides bioactifs entraîne une augmentation importante du coût de production. Il a d'ailleurs été estimé que 70 % du coût d'un procédé était lié aux étapes post-production (Agyei *et al.*, 2016). La purification des peptides permet entre autres d'éviter les interférences liées à d'autres molécules présentes dans le milieu de fermentation (Daliri *et al.*, 2017) et permet d'obtenir un produit pur et de qualité, des critères recherchés par l'industrie pharmaceutique.

5.3. Utilisation de protéases pariétales partiellement purifiées

Au cours de la fermentation, l'hydrolyse des protéines est initiée par les CEPs. Ces enzymes participent d'ailleurs majoritairement à la libération de peptides et peuvent donc être utilisées seules pour une hydrolyse *in vitro* de différentes protéines. Cette stratégie est d'autant plus justifiée par le fait que les conditions optimales d'activité des CEPs peuvent être différentes des conditions requises pour la croissance bactérienne (Gnasegaran *et al.*, 2017). Dans ce contexte, la fermentation n'est pas requise pour la production de peptides mais un milieu défini et contrôlé pour une activité enzymatique optimale qui permet une production plus importante de peptides en comparaison avec les stratégies décrites précédemment. La principale limite réside dans l'isolement des CEPs à partir d'une culture de *Lactobacillus*, isolation qui présente souvent un faible rendement d'extraction. La méthode est donc surtout utilisée afin d'évaluer les spécificités des protéases plutôt que pour la production de peptides bioactifs. Avant de réaliser l'hydrolyse des protéines, une étape de production et d'extraction des CEPs est requise (Sadat-Mekmene *et al.*, 2011b) ainsi que l'évaluation des conditions optimales pour l'activité de l'enzyme (Ayyash *et al.*, 2012). A titre d'exemple, différentes CEPs ont été isolées et partiellement purifiées à partir de cultures de *L. helveticus*. Les enzymes en question présentent des propriétés extrêmement variées comme des températures optimales allant de 40 à 50°C, des pH optimaux allant de 5,5 à 8 et parfois le besoin d'ions calcium comme activateurs (Sadat-Mekmene *et al.*, 2011b).

Il est établi que les CEPs sont retrouvées soit sous forme ancrée à la paroi bactérienne soit sous forme libre excrétée dans le milieu extracellulaire. Ces différences semblent être dépendantes des espèces considérées. Une CEP produite par *L. zae* est sécrétée dans le milieu extérieur tandis que différentes souches de *L. plantarum* semblent posséder des CEPs ancrées à la paroi (Vukotić *et al.*, 2016). La localisation différentielle des CEPs détermine la méthode d'extraction à suivre. Ainsi l'extraction des protéases pariétales chez *L. helveticus* a déjà été réalisé en utilisant un tampon Tris-EDTA (Elfahri *et al.*, 2014), l'extrait obtenu a ensuite été soumis à des étapes de purification telle que la chromatographie échangeuse d'ions (Minervini *et al.*, 2003). Afin d'augmenter le rendement en CEPs produites ou extraites, l'optimisation des conditions de culture a été étudiée pour différentes espèces de *Lactobacillus* comme *L. plantarum* (Kurniati *et al.*, 2015), *L. delbrueckii* (Nour *et al.*, 2014) ou encore *L. delbrueckii* ss *lactis* (Agyei *et al.*, 2012).

Plusieurs études ont suivis l'hydrolyse *in vitro* de protéines par des CEPs extraites. La souche *L. acidophilus* JQ-1 a été utilisée afin de produire une CEP destinée à l'hydrolyse de la caséine

β et les résultats ont mis en évidence la production d'inhibiteurs de l'ACE suite à l'hydrolyse (Ren *et al.*, 2015). Les CEPs extraites de la souche *L. helveticus* PR4 ont été partiellement purifiées et utilisées pour hydrolyser 6 caséinates de sodium provenant de différents laits (vache, brebis, chèvre, truie, taureau, bufflonne et humain). Parmi les hydrolysats générés, de nombreux inhibiteurs d'ACE ont été identifiés ainsi qu'un peptide antibactérien issu de la caséine β humaine (Minervini *et al.*, 2003). Une autre étude utilisa la souche *L. delbrueckii* ss *lactis* ATCC7830 afin de produire un extrait contenant les CEPs (Agyei *et al.*, 2012). La souche a par la suite été étudiée pour le développement d'un procédé continu de production de peptides inhibiteurs de l'ACE. Ce procédé combine la production de CEPs et l'hydrolyse des protéines laitières suivi de la purification des peptides produits. Bien que le coût du procédé soit relativement élevé, les résultats obtenus sont prometteurs pour de futurs développements de procédés (Gnasegaran *et al.*, 2017).

L'utilisation de CEPs partiellement purifiées pour la production de peptides bioactifs est une approche prometteuse pour l'hydrolyse des protéines sans procédé de fermentation. Cela permet d'éviter des interférences avec d'autres composés vis-à-vis de l'activité biologique (Daliri *et al.*, 2017). Certaines études se concentrent sur l'optimisation des CEPs en vue de l'amélioration du rendement de peptides libérés, par exemple, l'immobilisation enzymatique a été développée afin d'augmenter l'activité et la stabilité des CEPs (Agyei & He, 2015). De futurs travaux devraient permettre d'améliorer les taux de CEPs extraites à partir d'une culture bactérienne ainsi que leur activité. En effet, l'inconvénient de cette stratégie réside dans la nécessité d'ajouter une étape fastidieuse de production des CEPs avant l'hydrolyse des protéines, le rendement d'extraction étant faible et l'activité enzymatique peu stable après extraction. L'utilisation d'enzymes commerciales en combinaison des CEPs est une approche envisagée pour pallier à ce problème (Hafeez *et al.*, 2014).

Tableau 14 : Méthodes de production de peptides bioactifs par utilisation des *Lactobacilles* : avantages et inconvénients.

CEP : Cell Envelope Proteinase, DGI : Digestion Gastro-Intestinale.

Stratégies de production	Avantages	Inconvénients	Références
Fonctionnalisation d'un produit alimentaire par fermentation	Développement d'un produit alimentaire fonctionnalisé	Activité biologique peut être attribuée aux peptides issus de la DGI des protéines non hydrolysées	Daliri <i>et al.</i> , 2017; Hafeez <i>et al.</i> , 2014; Li <i>et al.</i> , 2017a; Marco <i>et al.</i> , 2017; Wakai & Yanamoto, 2012
	Production et fonctionnalisation simultanées	Activité biologique peut être attribuée à d'autres composés produits au cours de la fermentation	
	Purification des peptides non nécessaire		
Extraction et/ou purification des peptides bioactifs à partir d'un milieu de fermentation	De nombreuses applications (alimentaire, pharmaceutique, cosmétique)	Coût élevé des procédés d'extraction et de purification	Agyei <i>et al.</i> , 2016; Korhonen & Pihlanto, 2006
	Pas d'interférences avec d'autres composés produits au cours de la fermentation		
	Permet d'enrichir le produit final en peptides bioactifs		
Utilisation de CEPs partiellement purifiées	De nombreuses applications (alimentaire, pharmaceutique, cosmétique)	Nécessite un procédé de production et/ou extraction des CEPs	Gnasegaran <i>et al.</i> , 2017; Korhonen & Pihlanto, 2006; Sadat-Mekmene <i>et al.</i> , 2011b
	Pas d'interférences avec d'autres composés produits au cours de la fermentation	Faible rendement de CEPs extraites d'une culture bactérienne	
	Peut augmenter la quantité de peptides produits	Requiert une détermination des conditions optimales pour l'activité des CEPs	
	Peut être réalisée en combinaison avec des enzymes commerciales	Une étape supplémentaire d'extraction et/ou purification des peptides peut être requise	
		Difficultés de la montée en échelle	

Tableau 15 : Applications des peptides bioactifs produits par les *Lactobacilles* en fonction des différentes méthodologies de production.

ACE : Angiotensin Converting Enzyme.

Sources protéiques	Espèces	Activités	Références
<i>Fonctionnalisation d'un produit alimentaire</i>			
Lait de vache	<i>L. helveticus</i>	Inhibition de l'ACE	Shuangquan <i>et al.</i> , 2008; Wakai & Yanamoto, 2012
Lait de vache	<i>L. helveticus</i>	Immunomodulation	Matar <i>et al.</i> , 2001
Lait de vache	<i>L. helveticus</i>	Minéralisation des os	Narva <i>et al.</i> , 2004a
Lait de vache	<i>L. casei</i>	Inhibition de l'ACE	Li <i>et al.</i> , 2017a
Lait de vache	<i>L. casei</i>	Minéralisation des os	Kim <i>et al.</i> , 2009
Laits de vache et chamelle	<i>L. plantarum</i> , <i>L. paraplantarum</i> , <i>L. kefiri</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. paracasei</i>	Antioxydant	Soleymanzadeh <i>et al.</i> , 2016
Pois	<i>L. plantarum</i>	Inhibition de l'ACE	Jakubczyk <i>et al.</i> , 2013
Lait de soja	<i>L. plantarum</i>	Inhibition de l'ACE, antioxydant	Singh & Vij, 2017
<i>Extraction et purification des peptides d'un produit fermenté</i>			
Lait de vache ou petit lait	<i>L. helveticus</i>	Inhibition de l'ACE, anti-tumoral	Ahtesh <i>et al.</i> , 2016; LeBlanc <i>et al.</i> , 2002
Lait de vache	<i>L. plantarum</i>	Anti-inflammatoire, antihémolytique, antioxydant, anti-mutagénique, antimicrobien	Aguilar-Toalá <i>et al.</i> , 2017
Lait de vache	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Inhibition de l'ACE	Gandhi & Shah, 2014
Lait de vache	<i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i>	Inhibition de l'ACE, antioxydant	Solieri <i>et al.</i> , 2015
Lait de vache	<i>L. paracasei</i>	Hypertensif	Cheng & Pan, 2017
Lait de vache	<i>L. casei</i>	Inhibition de l'ACE	Han <i>et al.</i> , 2012
Lait de vache	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Inhibition de l'ACE, immunomodulation	Kliche <i>et al.</i> , 2017
Laits de vache et chamelle	<i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i>	Inhibition de l'ACE, de l' α -glucosidase et de l' α -amylase, antioxydant	Ayyash <i>et al.</i> , 2017
Caseinate de sodium bovin	<i>L. acidophilus</i>	Antimicrobien	Hayes <i>et al.</i> , 2006
<i>Utilisation de CEPs partiellement purifiées pour l'hydrolyse des protéines</i>			
Caséine β bovine	<i>L. acidophilus</i>	Inhibition de l'ACE	Ren <i>et al.</i> , 2015
Caseinate de sodium (différentes sources)	<i>L. helveticus</i>	Inhibition de l'ACE	Minervini <i>et al.</i> , 2003
Lait de vache	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	Inhibition de l'ACE	Gnasegaran <i>et al.</i> , 2017

II. Objectifs

L'utilisation de Lactobacilles pour la production de peptides bioactifs constitue une approche prometteuse pour le développement de produits destinés à la prévention de l'ostéoporose. Les peptides bioactifs peuvent en effet conférer de nombreux bénéfices santé en agissant sur différents organes et systèmes du corps humain, dont le système osseux.

En outre, de par leur système protéolytique particulier, les Lactobacilles peuvent libérer différents peptides à partir de sources protéiques variées. Il semble que les activités et les spécificités des protéases pariétales soient souche dépendantes, démontrant la capacité de ces bactéries à produire une large diversité de séquences peptidiques. Plusieurs procédés de production de peptides, utilisant les Lactobacilles, existent et peuvent conduire au développement d'aliments fonctionnels ou d'hydrolysats peptidiques issus de la fermentation.

Dans ce contexte, l'objectif de cette partie du travail concerne la mise en évidence de souches bactériennes issues de la collection de Mongolie, pouvant être utilisées pour la production de peptides bioactifs, eux-mêmes utilisables pour la prévention de l'ostéoporose. Le projet a été conduit selon une approche conventionnelle de recherche de peptides bioactifs en sélectionnant le lait bovin comme milieu de fermentation et substrat protéique. Au vu du nombre de souches dans la collection, une stratégie de criblage a été réalisée afin de sélectionner des souches hautement protéolytiques, considérées comme plus à même de libérer une importante quantité de peptides. Par la suite, les hydrolysats peptidiques ont été produits par fermentation en bioréacteur. Une attention toute particulière a été portée lors de l'étude des activités biologiques des hydrolysats. En effet, afin d'être au plus proche des conditions *in vivo*, une DGI a été simulée sur ces hydrolysats avant d'étudier leurs effets biologiques. L'objectif est également de démontrer l'impact de la fermentation et de la production de peptides par les bactéries, sur l'activité biologique observée, ceci au moyen d'un contrôle non fermenté. L'ultime objectif de cette partie du travail a été de démontrer la faisabilité d'un procédé de production en continue d'un hydrolysats protéique d'intérêt.

III. Résultats

1. Sélection de souches présentant d'importantes activités protéolytiques

Afin de sélectionner un nombre restreint de souches pour la production d'hydrolysats peptidiques, un test en puits d'agar a été réalisé sur gélose au lait pour évaluer l'activité protéolytique des souches de la collection. Une forte variabilité est observée entre les souches bactériennes (**Tableau, Annexe 1**), les diamètres des zones claires autour des puits varient entre 0 et 39 mm. Les souches présentant les plus importantes activités protéolytiques (avec une zone claire de plus de 28 mm de diamètre) appartiennent aux espèces *L. helveticus* et *L. delbrueckii*.

Quinze souches de *Lactobacillus* ont été retenues (**Tableau 16**), dont 9 font partie de l'espèce *L. helveticus* et 6 de l'espèce *L. delbrueckii* pour être étudiées dans le cadre d'une seconde étape de criblage.

Tableau 16 : Liste des souches sélectionnées suite au criblage de l'activité protéolytique sur gélose au lait.

Souche	Espèce	Diamètre du halo (mm)	Ecart-type (mm)
23b	<i>L. delbrueckii</i>	33	3
33c	<i>L. delbrueckii</i>	32	2
34b	<i>L. delbrueckii</i>	39	3,5
48b	<i>L. delbrueckii</i>	30	0
50b	<i>L. delbrueckii</i>	30	1,5
56a	<i>L. delbrueckii</i>	28	1,1
16b	<i>L. helveticus</i>	31	1,5
25b	<i>L. helveticus</i>	32	1
25c	<i>L. helveticus</i>	32	2
45a	<i>L. helveticus</i>	32	4
46b	<i>L. helveticus</i>	35	2,6
47d	<i>L. helveticus</i>	32	1
49d	<i>L. helveticus</i>	35	4,3
58b	<i>L. helveticus</i>	37	1,7
60b	<i>L. helveticus</i>	35	1

2. Analyse multiparamétrique de cultures en lait écrémé

Cette stratégie de criblage repose sur des cultures réalisées en lait écrémé pendant 48 h à partir des souches sélectionnées. Ces cultures sont ensuite étudiées pour différents paramètres comme la capacité d'acidification, la croissance bactérienne, la détection des gènes codant pour les

CEPs, et enfin la quantification, l'évaluation des poids moléculaire apparents et l'identification des peptides produits au cours de la fermentation.

2.1. Première étape de l'analyse multiparamétrique

2.1.1. Comportements des souches après culture en lait écrémé

Les souches sélectionnées ont été cultivées en lait écrémé pendant 48 h et après incubation, la croissance et l'acidification ont été mesurées. Au niveau de la croissance, une forte différence est observée entre les souches de *L. helveticus* et *L. delbrueckii*, atteignant respectivement une DO_{600nm} moyenne de 2,7 et de 0,85 (**Tableau 17**).

Tableau 17 : Résultats de la première étape de l'analyse multiparamétrique.

Les diamètres des halos de protéolyse obtenus sur gélose au lait ainsi que les résultats issus des fermentations en lait écrémé : croissance, acidification, quantification des peptides produits et intégrations des chromatogrammes obtenus après analyse par SEC. * Les moyennes $\pm$ écart type ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tukey (p value < 0,05).

Souche	Espèce	Diamètre sur gélose lait (mm)	Acidification (pH)	Croissance (DO)	Dosage Folin (g/L)	Aire totale (mAU)	%PHPMs	%PBPMs	%PHPMs/Lait	%PBPMs/Lait
Lait	×	×	6,45 $\pm$ 0,05 ^e	×	2,06 $\pm$ 0,62 ^a	347,51 $\pm$ 42,8 ^a	85,62 $\pm$ 2,72 ^s	14,39 $\pm$ 2,72 ^a	100 ^d	100 ^a
23b	<i>L. delbrueckii</i>	33 $\pm$ 3 ^{ac}	4,52 $\pm$ 0,02 ^c	0,739 $\pm$ 0,01 ^{ac}	4,86 $\pm$ 0,21 ^{ad}	101,48 $\pm$ 31,8 ^a	61,37 $\pm$ 3,44 ^{df}	40,06 $\pm$ 5,13 ^{bc}	19,74 $\pm$ 5,66 ^{ab}	123,32 $\pm$ 52,81 ^a
33c	<i>L. delbrueckii</i>	32 $\pm$ 2 ^{ac}	4,64 $\pm$ 0,02 ^c	0,825 $\pm$ 0,126 ^{ac}	5,54 $\pm$ 0,61 ^{bcd}	141,65 $\pm$ 27,2 ^a	54,83 $\pm$ 1,28 ^{cde}	45,98 $\pm$ 2,43 ^{bc}	24,69 $\pm$ 4,3 ^{ab}	194,64 $\pm$ 47,3 ^a
34b	<i>L. delbrueckii</i>	39 $\pm$ 3,5 ^c	4,52 $\pm$ 0,02 ^c	0,987 $\pm$ 0,03 ^{bc}	5,32 $\pm$ 0,21 ^{ad}	115,96 $\pm$ 4,35 ^a	59,07 $\pm$ 3,17 ^{df}	41,08 $\pm$ 3,35 ^{bc}	21,79 $\pm$ 0,37 ^{ab}	141,83 $\pm$ 16,75 ^a
48b	<i>L. delbrueckii</i>	30 $\pm$ 0 ^{ac}	4,68 $\pm$ 0,01 ^c	0,473 $\pm$ 0,118 ^{ab}	3,59 $\pm$ 0,19 ^{ad}	123,56 $\pm$ 12,3 ^a	57,26 $\pm$ 1,76 ^{de}	44,14 $\pm$ 2,52 ^{bc}	22,50 $\pm$ 1,65 ^{ab}	162,65 $\pm$ 24,69 ^a
50b	<i>L. delbrueckii</i>	30 $\pm$ 1,5 ^{ab}	4,51 $\pm$ 0 ^c	0,973 $\pm$ 0,199 ^{bc}	4,89 $\pm$ 0,3 ^{bcd}	114,70 $\pm$ 12,5 ^a	58,12 $\pm$ 6,22 ^{de}	40,90 $\pm$ 4,26 ^{bc}	21,12 $\pm$ 1,81 ^{ab}	140,37 $\pm$ 28,22 ^a
56a	<i>L. delbrueckii</i>	28 $\pm$ 1,1 ^a	4,52 $\pm$ 0,01 ^c	1,14 $\pm$ 0,124 ^c	5,58 $\pm$ 0,29 ^{bcd}	131,81 $\pm$ 35,8 ^a	58,35 $\pm$ 3,93 ^{df}	42,32 $\pm$ 5,03 ^{bc}	24,21 $\pm$ 4,98 ^{ab}	169,25 $\pm$ 65,55 ^a
16b	<i>L. helveticus</i>	31 $\pm$ 1,5 ^{ab}	3,56 $\pm$ 0,05 ^b	2,79 $\pm$ 0,03 ^{de}	4,49 $\pm$ 0,02 ^{ac}	184,11 $\pm$ 46,7 ^a	34,14 $\pm$ 1,98 ^{ab}	73,24 $\pm$ 2,06 ^{de}	19,89 $\pm$ 4,18 ^{ab}	400,81 $\pm$ 103,87 ^{ab}
25b	<i>L. helveticus</i>	32 $\pm$ 1 ^{ac}	3,48 $\pm$ 0,1 ^{ab}	3,18 $\pm$ 0,194 ^{df}	4,17 $\pm$ 0,68 ^{ad}	155,52 $\pm$ 4,92 ^a	38,83 $\pm$ 2,2 ^{ab}	64,62 $\pm$ 1,89 ^{de}	15,39 $\pm$ 0,6 ^a	503,42 $\pm$ 297,66 ^{ab}
25c	<i>L. helveticus</i>	32 $\pm$ 2 ^{ac}	3,45 $\pm$ 0,17 ^{ab}	2,62 $\pm$ 0,138 ^d	6,78 $\pm$ 1,63 ^d	268,7 $\pm$ 121,8 ^a	20,13 $\pm$ 3,6 ^a	85,7 $\pm$ 7,47 ^e	16,91 $\pm$ 6,77 ^a	678,54 $\pm$ 309,89 ^b
45a	<i>L. helveticus</i>	32 $\pm$ 4 ^{ac}	3,32 $\pm$ 0,04 ^a	3,57 $\pm$ 0,12 ^f	6,16 $\pm$ 1,32 ^{bcd}	289,95 $\pm$ 52 ^a	40 $\pm$ 3,74 ^{ad}	60,1 $\pm$ 3,77 ^{cd}	37,35 $\pm$ 11,95 ^{ac}	514,7 $\pm$ 86,67 ^{ab}
46b	<i>L. helveticus</i>	35 $\pm$ 2,6 ^{ac}	3,39 $\pm$ 0,1 ^{ab}	3,03 $\pm$ 0,02 ^{df}	4,44 $\pm$ 0,17 ^{ad}	139,24 $\pm$ 6,51 ^a	37 $\pm$ 3,1 ^{abc}	74,2 $\pm$ 3,67 ^{de}	16,37 $\pm$ 0,74 ^a	307,41 $\pm$ 27,56 ^{ab}
47d	<i>L. helveticus</i>	32 $\pm$ 1 ^{ac}	3,34 $\pm$ 0,04 ^{ab}	3,12 $\pm$ 0,326 ^{df}	5,01 $\pm$ 0,8 ^{ad}	170,7 $\pm$ 52,9 ^a	44,73 $\pm$ 12,24 ^{bd}	58,91 $\pm$ 16,94 ^{cd}	23,93 $\pm$ 7,31 ^{ab}	297,41 $\pm$ 114,8 ^{ab}
49d	<i>L. helveticus</i>	35 $\pm$ 4,3 ^{ac}	3,43 $\pm$ 0,01 ^{ab}	2,72 $\pm$ 0,05 ^d	4,46 $\pm$ 0,46 ^{ad}	225,08 $\pm$ 118,3 ^a	58,56 $\pm$ 14,51 ^{ef}	42,19 $\pm$ 14,63 ^b	43,87 $\pm$ 29,24 ^{bc}	263,68 $\pm$ 77,95 ^{ab}
58b	<i>L. helveticus</i>	37 $\pm$ 1,7 ^{ab}	3,44 $\pm$ 0,01 ^{ab}	3,403 $\pm$ 0,394 ^{ef}	5,95 $\pm$ 1,36 ^{cd}	263,89 $\pm$ 21,7 ^a	59,24 $\pm$ 8,93 ^{df}	40,79 $\pm$ 8,95 ^{bc}	49,48 $\pm$ 4,74 ^c	322,98 $\pm$ 93,51 ^{ab}
60b	<i>L. helveticus</i>	35 $\pm$ 1 ^{ac}	3,49 $\pm$ 0,11 ^{ab}	2,81 $\pm$ 0,257 ^{de}	5,09 $\pm$ 0,91 ^{ad}	303,15 $\pm$ 165,9 ^a	46,4 $\pm$ 6,48 ^{bd}	59,41 $\pm$ 8,02 ^{cd}	29,10 $\pm$ 7,85 ^{ac}	526,87 $\pm$ 274,97 ^{ab}

La capacité d'acidification a été évaluée par mesure du pH de la culture après 48 h. Le pH initial du contrôle lait non inoculé (lait) de 6,5 atteint une valeur de 6,45 après incubation (**Tableau 17**). Comme il a été observé pour la croissance, une différence significative est observée entre les souches de *L. helveticus* et *L. delbrueckii* en terme de capacité d'acidification. Quasiment toutes les souches de *L. helveticus* entraînent une diminution de 3 unités de pH au minimum,

avec une moyenne de 3,68 après incubation, tandis que les souches de *L. delbrueckii* conduisent à une diminution de maximum 2 unités de pH pour une moyenne de 4,57 après 48 h.

Dans toutes les cultures excepté le contrôle lait non inoculé, la fermentation a conduit à une précipitation des caséines du fait de la diminution du pH en dessous de 4,6. De plus, ces données indiquent que dans le lait écrémé, les souches de *L. helveticus* sont plus efficaces que les autres souches pour la croissance et la capacité d'acidification.

Les peptides produits au cours de la fermentation ont été extraits et quantifiés par dosage au réactif de Folin-Ciocalteu. Pour toutes les souches étudiées, les résultats montrent un enrichissement en peptides après fermentation (**Tableau 17**). La concentration en peptides dans le lait non inoculé est de 2,06 g.L⁻¹ tandis qu'après 48 h de fermentation en présence des souches bactériennes, cette concentration est supérieure à 4 g.L⁻¹. Les souches de *L. helveticus* produisent plus de peptides que les souches de *L. delbrueckii* avec des concentrations respectives en peptides de 5,17 et 4,96 g.L⁻¹. Les souches *L. helveticus* 25c et 45a sont celles qui génèrent les concentrations en peptides les plus importantes avec 6 g.L⁻¹ après culture.

Les profils de poids moléculaires apparents des peptides générés au cours de la fermentation ont été analysés par SEC. Le profil obtenu après fermentation montre 2 régions distinctes (**Figure 51**), une zone correspondant à des protéines/peptides de haut poids moléculaire (PHPM) supérieurs à 1.700 Da et une région de peptides de bas poids moléculaire (PBPM) inférieurs à 1700 Da.

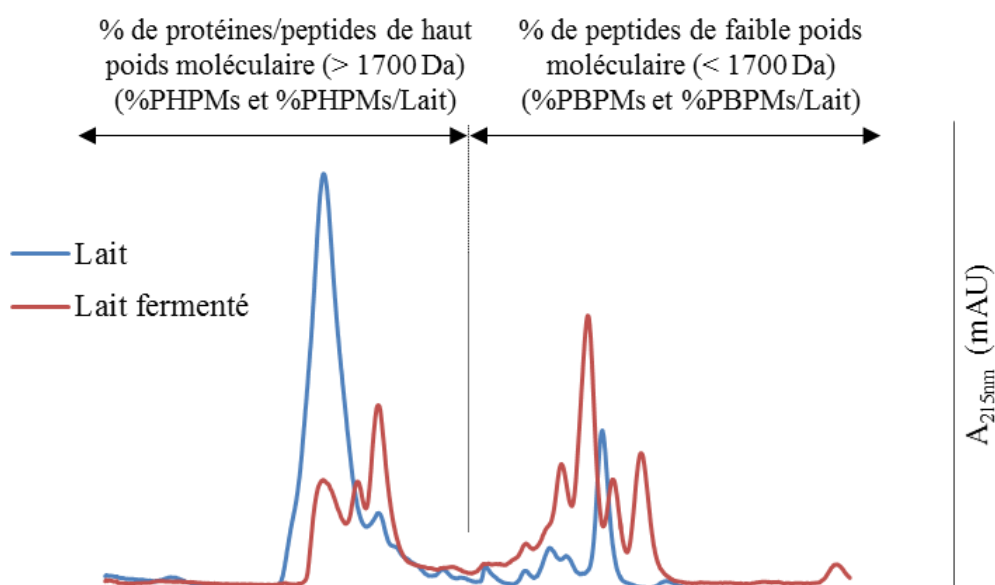


Figure 51 : Exemples de profils obtenus par SEC à partir des peptides extraits des cultures en lait écrémé.

En bleu, le lait non inoculé et en rouge un lait fermenté pendant 48 h. Les profils ont été obtenus en utilisant une colonne Superdex Peptide 10/300 GL équilibrée en milieu ACN/H₂O/TFA (30/70/0,1 % v/v/v) selon une élution isocratique à un débit de 0,5 mL.min⁻¹.

Les profils obtenus pour chaque culture ont été analysés par intégration des aires sous la courbe de ces deux régions et ont été exprimés soit en fonction de l'aire totale du chromatogramme soit en fonction de l'aire correspondante obtenue pour la condition contrôle lait (**Tableau 17**). Les proportions en PHPM et PBPM dans le lait non inoculé sont respectivement de 85,6 et 14,4 %. Comme il a été observé lors du dosage des peptides, la fermentation du lait par les souches bactériennes conduit à une augmentation de la proportion en PBPM pour une diminution de la quantité relative de PHPM en comparaison du contrôle (**Figure 51**) mettant en évidence l'impact de la protéolyse au cours de la fermentation. Encore une fois, une différence significative est observée entre les souches de *L. helveticus* en comparaison avec les souches de *L. delbrueckii*, ces dernières présentant en moyenne une proportion de PBPM 1,5 fois supérieure au contrôle tandis que les souches de *L. helveticus* une proportion 4,2 plus importante que le lait non inoculé (**Tableau 17**). La plus importante activité protéolytique est observée pour la souche *L. helveticus* 25c avec un pourcentage de PBPM 6,7 fois supérieur au contrôle.

2.1.2. Analyse de l'ensemble des paramètres

Une première ACP a été réalisée à partir du **Tableau 17** afin d'évaluer les corrélations entre les différents paramètres : le diamètre de protéolyse sur gélose lait, la croissance, l'acidification et l'évaluation de la quantité de peptides produits par fermentation. Le graphe des variables (**Figure 52A**) présente des composantes principales (dimension 1 et 2) expliquant respectivement 60,82 et 23,56 % de la variance totale.

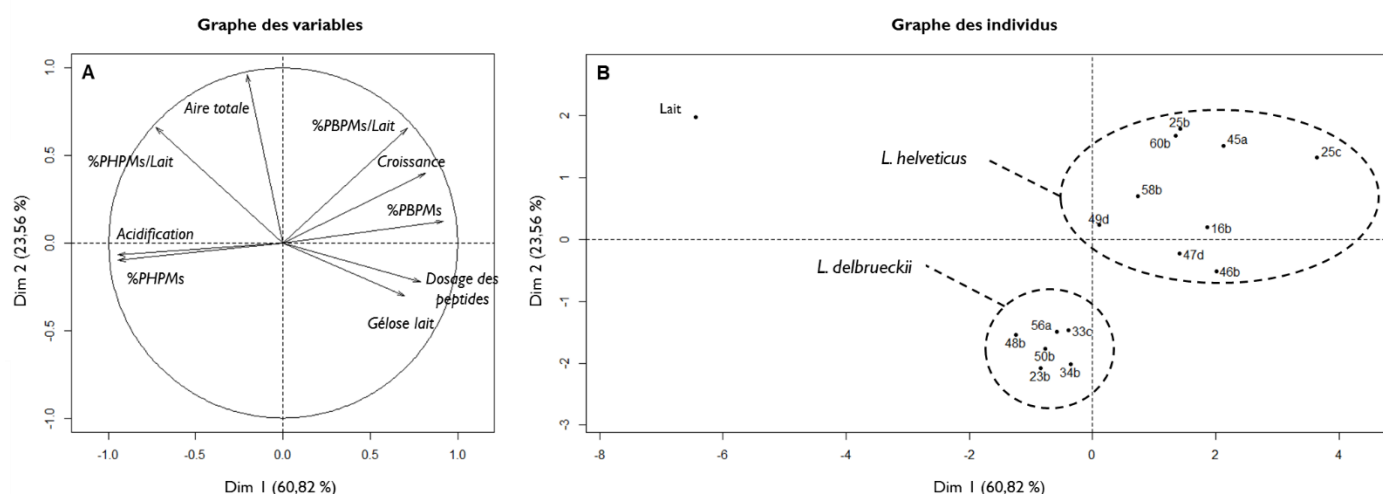


Figure 52 : Analyse en composantes principales réalisée à partir des variables issues de la première étape de l'analyse multiparamétrique pour les 15 souches sélectionnées.

Les variables ont été regroupées en deux composantes principales (Dim 1 et Dim 2).

A : graphe des variables représentant les corrélations entre les différents paramètres, **B** : graphe des individus représentant la répartition des souches sélectionnées et de la condition contrôle (lait) en fonction des dimensions 1 et 2.

Une corrélation positive est observée entre l'acidification et la proportion de PHPM (% PHPMs). De plus, la croissance bactérienne est corrélée avec un ensemble de variables liées à la production de peptides ou la protéolyse : le dosage des peptides, le %PBPM, le % PBPM/Lait et le diamètre de protéolyse sur gélose lait. L'acidification et les proportions de PHPM sont quant à elles négativement corrélées à la croissance, la proportion de PBPM ou encore les résultats du test de protéolyse sur gélose lait.

Concernant le graphe des individus (**Figure 52B**), toutes les souches testées sont clairement séparées de la condition contrôle lait. Les souches de *L. delbrueckii* forment un groupe homogène placé sur les parties négatives des dimensions 1 et 2 alors que les *L. helveticus* sont plus dispersées sur les parties positives des 2 dimensions.

2.2. Deuxième étape de l'analyse multiparamétrique

2.2.1. Distribution des gènes codant pour les protéases pariétales

L'analyse de la distribution des gènes codant les CEPs a été réalisée par PCR sur les souches étudiées ainsi que sur la souche *L. helveticus* CNRZ32 utilisée en tant que contrôle car elle possède les 4 gènes *prtH*.

Le gène *prtB* codant pour l'unique protéase pariétale de *L. delbrueckii* a été détecté chez toutes les souches de cette espèce mais pas chez les souches *L. helveticus* (**Tableau 18**). Le gène *prtH1* a été retrouvé chez 6 souches de *L. helveticus* (*L. helveticus* 16b, 25b, 25c, 49d, 58b et 60b) ainsi que chez la souche *L. helveticus* CNRZ32. De manière remarquable, toutes les souches présentant le gène *prtH1* ont été initialement isolées à partir de lait de jument. Les gènes *prtH2* et *prtH3* ont été détectés chez 3 souches de *L. helveticus* (*L. helveticus* 45a, 46b et 47d) ainsi que pour la souche de référence. Enfin le gène *prtH4* n'a été détecté que pour la souche *L. helveticus* CNRZ32.

Tableau 18 : Distribution des gènes codant pour les CEPs parmi les souches sélectionnées. Les gènes ont été détectés par PCR et 5 couples d'amorces ont été utilisés.

Souche	Espèce	<i>prtH1</i>	<i>prtH2</i>	<i>prtH3</i>	<i>prtH4</i>	<i>prtB</i>	Source
23b	<i>L. delbrueckii</i>					+	Lait de vache
33c	<i>L. delbrueckii</i>					+	Lait de vache
34b	<i>L. delbrueckii</i>					+	Lait de chamelle
48b	<i>L. delbrueckii</i>					+	Lait de vache
50b	<i>L. delbrueckii</i>					+	Lait de yak
56a	<i>L. delbrueckii</i>					+	Lait de yak
CNRZ32	<i>L. helveticus</i>	+	+	+	+		CIRM (INRA)
16b	<i>L. helveticus</i>	+					Lait de jument
25b	<i>L. helveticus</i>	+					Lait de jument
25c	<i>L. helveticus</i>	+					Lait de jument
49d	<i>L. helveticus</i>	+					Lait de jument
58b	<i>L. helveticus</i>	+					Lait de jument
60b	<i>L. helveticus</i>	+					Lait de jument
45a	<i>L. helveticus</i>		+	+			Lait de yak
46b	<i>L. helveticus</i>		+	+			Lait de vache + yak
47d	<i>L. helveticus</i>		+	+			Lait de chamelle

2.2.2. Identification et analyse des peptides produits

Une approche de peptidomique a été conduite afin d'analyser les peptides endogènes et exogènes produits puis extraits à partir des cultures en lait écrémé. Les résultats issus de la condition contrôle lait ont permis d'établir le niveau basal de l'hétérogénéité des peptides. Au total, 596 peptides appartenant à 22 protéines du lait ont été identifiés dans cette condition, dont 32 % des peptides issus de la caséine- β . En comparaison, entre 150 et 722 séquences peptidiques ont été identifiées dans les cultures inoculées par les souches étudiées avec des proportions quantitatives de séquences issues de la caséine β largement majoritaires, comprises entre 44 et 67 %.

Du fait de l'importante proportion des peptides issus de la caséine β ainsi que de son abondance naturelle dans le lait, l'analyse de l'hétérogénéité des peptides produits a été conduite en se focalisant sur la caséine β .

Les cartes de chaleur de la caséine β ont été construites pour toutes les souches étudiées. La **Figure 53** présente les cartes obtenues pour les souches *L. helveticus* 60b (*prtH1*) et *L. helveticus* 47d (*prtH2/prtH3*).

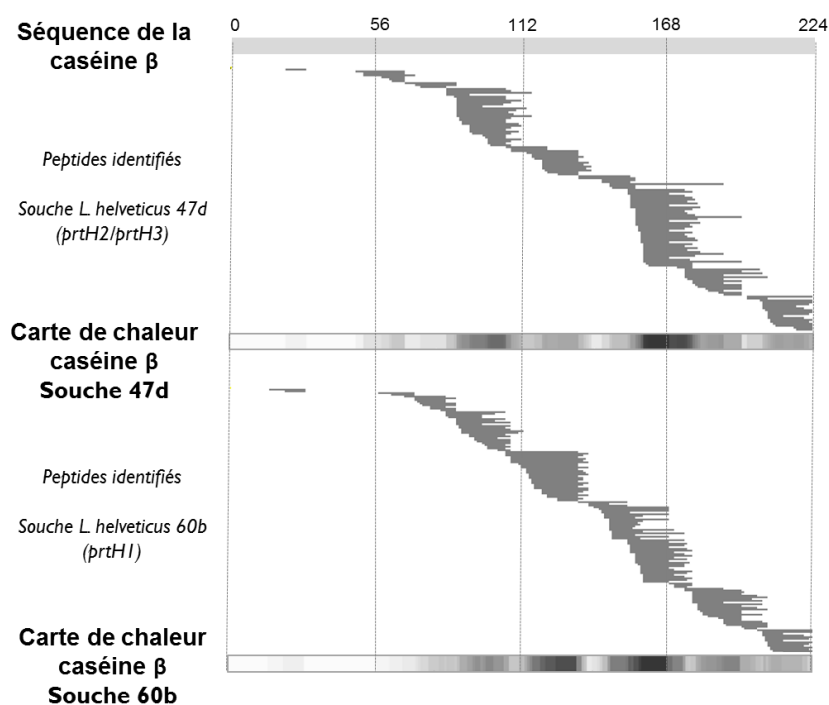


Figure 53 : Cartes de chaleur de la caséine β construites à partir des peptides identifiés par spectrométrie de masse.

Exemple de la souche *L. helveticus* 47d (*prtH2/prtH3*) et de la souche *L. helveticus* 60b (*prtH1*). Les cartes de chaleur en dessous des peptides identifiés représentent la fréquence des acides aminés. Une couleur a été associée à chaque acide aminé, du blanc (fréquence d'apparition nulle) au gris foncé (fréquence d'apparition élevée).

Par ce genre de représentation, tous les peptides identifiés sont repositionnés (multiples barres grises horizontales sur la **Figure 53**) sur la séquence de la caséine β , illustrant ainsi le profil de protéolyse de la caséine. Un faible nombre de peptides sont issus de la partie N terminale de la protéine (le peptide signal exclu). La majorité des peptides identifiés proviennent de la séquence protéique de la caséine β comprise entre les acides aminés 56 et 224. La répartition des peptides sur la structure primaire de la protéine d'origine permet de définir une signature protéolytique. En effet, pour les deux souches de *L. helveticus* présentées en exemple (*L. helveticus* 47d et *L. helveticus* 60b) les profils protéolytiques sont différents car les zones les plus résistantes (en gris foncé sur les cartes de chaleurs) ne sont pas situées aux mêmes endroits de la protéine.

2.2.3. Analyse des corrélations entre les CEPs détectés et les peptides produits

Afin de comparer les signatures protéolytiques obtenues pour les 15 souches étudiées, une deuxième ACP a été réalisée à partir des données issues des cartes de chaleur. Pour le graphe des individus (**Figure 54A**), les composantes principales (dimensions 1 et 2) expliquent respectivement 43,11 et 31,43 % de la variance.

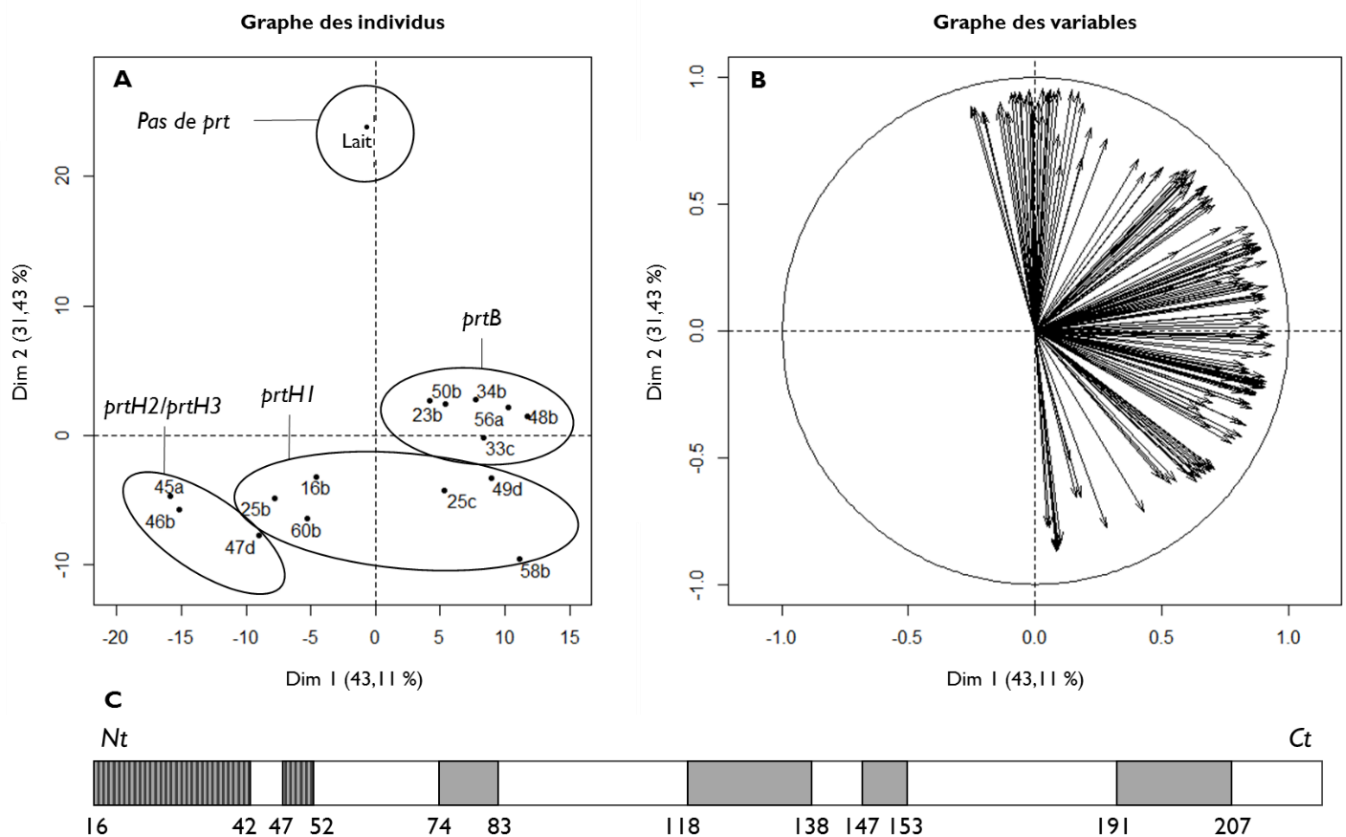


Figure 54 : Analyse en composantes principales des cartes de chaleur construites à partir des peptides identifiés.

Les variables ont été regroupées en deux composantes principales (Dim 1 et Dim 2).

A : graphe des individus représentant la répartition des souches sélectionnées et de la condition contrôle (lait) en fonction des dimensions 1 et 2. Les résultats obtenus lors de la détection des CEPs par PCR sont reportés sur le graphe via les cercles de regroupement, **B** : graphe des variables représentant les variables les plus impliquées ($\cos^2 > 0,85$) dans la construction des deux dimensions. Parmi l'ensemble des variables (209 acides aminés), 51 et 31 d'entre elles sont les plus impliquées dans respectivement les dimensions 1 et 2, **C** : représentation schématique de la séquence en acide aminé de la caséine β où les régions mises en évidence représentent les acides aminés les plus impliqués dans la construction des deux dimensions (51 acides aminés pour Dim 1, couleur pleine et 31 acides aminés pour Dim 2, en rayés).

Les gènes codant pour les CEPs détectés par PCR sont reportés sur la figure pour chaque souche. L'ACP a conduit au regroupement des souches en fonction des protéases pariétales détectées. A l'instar de la première ACP, la condition contrôle lait (pas de gène *prt*) est nettement séparée des autres individus et dépend uniquement de la dimension 2. Les souches de *L. delbrueckii* possédant le gène *prtB* sont regroupées ensemble au niveau des parties

positives des dimensions 1 et 2. Les souches de *L. helveticus* se retrouvent quant à elles éparpillées le long de la dimension 1 et dans la partie négative de la dimension 2. Plus particulièrement, les souches possédant le gène *prtH1* sont séparées des individus ayant les gènes *prtH2* et *prtH3*. Une dispersion plus importante des souches présentant le gène *prtH1* est observée, avec 3 souches (*L. helveticus* 16b, 25b et 60b) positionnées sur la partie négative de la dimension 1, et les 3 autres (*L. helveticus* 25c, 49d et 58b) sur la partie positive. Cette dispersion pourrait refléter la présence de différents variants du gène *prtH1* qui ne peuvent être distingués par l'approche PCR.

La caséine β est composée de 209 acides aminés, le graphe des variables de l'ACP (**Figure 54B**) a été construit en utilisant les 209 variables correspondant à l'occurrence de ces acides aminés. Les variables permettant au mieux d'expliquer les deux dimensions de l'ACP peuvent être mis en évidence par analyse du graphe construit. En effet pour chaque variable, la valeur de $\cos^2$ calculée par l'ACP reflète l'importance de la variable pour une dimension donnée. Les variables majoritairement impliquées dans les dimensions 1 et 2 (définies par un $\cos^2 > 0,85$), permettent de distinguer les régions de la caséine β hydrolysées différemment par les souches. La dimension 2 correspond à la région N terminale de la caséine β (une région hydrophile), tandis que la dimension 1 correspond à différentes régions réparties le long de la protéine jusqu'à la partie C terminale (la partie hydrophobe de la caséine β) (**Figure 54C**). En résumé, cette représentation illustre les régions de la protéine préférentiellement hydrolysées au cours de la fermentation.

2.3. Sélection des souches pour la suite du projet

Pour la suite du projet, 3 souches ont été sélectionnées (**Tableau 19**) parmi les 15 souches étudiées au cours de l'analyse multiparamétrique de la protéolyse en lait écrémé. L'ensemble des paramètres étudiés ont permis de sélectionner ces souches selon différents critères.

Tableau 19 : Souches sélectionnées suite à l'analyse multiparamétrique.

Souche	Espèce	Protéases
45a	<i>L. helveticus</i>	PrtH2/PrtH3
49d	<i>L. helveticus</i>	PrtH1
60b	<i>L. helveticus</i>	PrtH1

Les souches de *L. delbrueckii* n'ont pas été retenues pour la suite à cause de leurs faibles capacités de croissance et d'acidification comparées aux souches de *L. helveticus*. Dans le but d'obtenir des hydrolysats peptidiques les plus différents les uns des autres, il a été convenu de sélectionner des souches présentant des profils d'hydrolyse de caséine β les plus distincts les uns des autres. Les résultats obtenus suite à la deuxième ACP ont permis de mettre en évidence, vis-à-vis de la production de peptides, les variations entre des souches possédant un génotype de CEPs. Pour rappel, une variation conséquente a été remarquée entre des souches possédant le gène *prtH1*. En définitive, la souche *L. helveticus* 45a (possédant les gènes *prtH2* et *prtH3*) ainsi que les souches *L. helveticus* 49d et *L. helveticus* 60b (possédant toutes deux le gène *prtH1*) ont été sélectionnées pour la suite du projet. Ces souches bactériennes vont être utilisées pour la production d'hydrolysats peptidiques à partir du lait par fermentation en bioréacteur.

3. Production de laits fermentés par batch-fermentation en bioréacteur

Des fermentations en mode batch ont été réalisées afin de produire les hydrolysats peptidiques qui seront par la suite étudiés pour différentes activités biologiques. Les 3 souches sélectionnées ont été cultivées comme défini dans le **paragraphe VI.1.** de la partie matériels et méthodes. Au cours de la fermentation, la croissance bactérienne et la production de peptides ont été suivies.

Les souches bactériennes sont inoculées à une DO_{600nm} de 0,3 en début de fermentation et après 31 h de culture, la concentration bactérienne atteint un état stationnaire pour les 3 souches (**Figure 55**). La plus importante concentration est retrouvée pour la souche *L. helveticus* 45a avec une DO_{600nm} d'environ 5 à partir de 31 h d'incubation. Les deux autres souches atteignent une DO_{600nm} comprise entre 3 et 4.

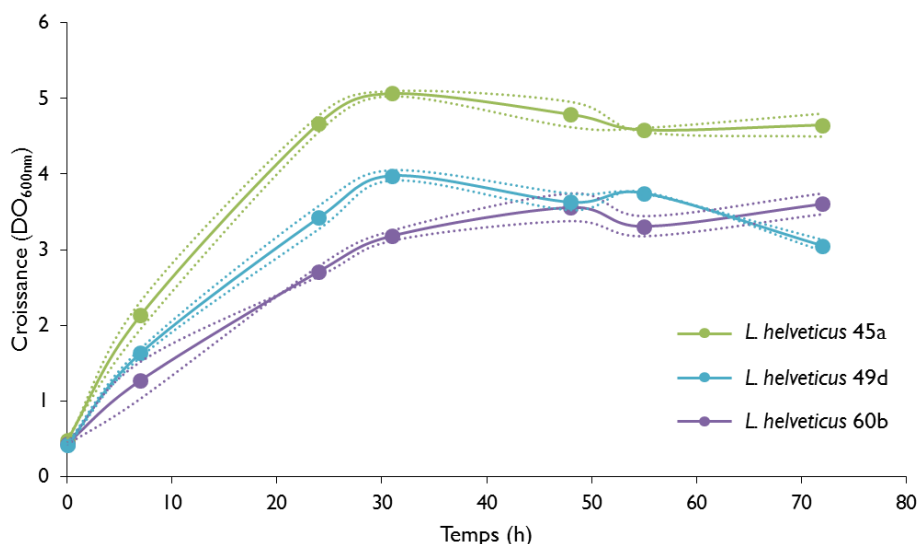


Figure 55 : Croissance des souches au cours de la fermentation du lait en mode batch. Courbes de croissance bactérienne en fonction du temps relatives à la souche *L. helveticus* 45a (en vert), à la souche *L. helveticus* 49d (en violet) et à la souche *L. helveticus* 60b (en bleu clair). La croissance bactérienne a été déterminée par mesure de la DO à 600 nm. Les souches ont été inoculées à une DO de 0,3. La croissance est représentée par la moyenne de deux fermentations indépendantes (courbes pointillées).

Concernant la production de peptides, la concentration initiale en peptides dans le milieu de culture était de 3,12 g.L⁻¹ au moment de l'inoculation des souches (**Figure 56**). Cette concentration va ensuite augmenter au cours de la fermentation en suivant la même tendance que celle observée pour la croissance bactérienne, soit une production importante au cours des premières 31 h de fermentation. Ensuite, la concentration peptidique va augmenter plus lentement jusqu'à la fin de la fermentation, voire même se stabiliser en fonction de la souche utilisée. La concentration en peptides la plus élevée est retrouvée dans le fermentât de la souche *L. helveticus* 45a (19,3 g.L⁻¹ après 72 h de culture) tandis que les souches *L. helveticus* 49d et 60b atteignent des concentrations respectives de 6,8 et 8,9 g.L⁻¹ de peptides après fermentation.

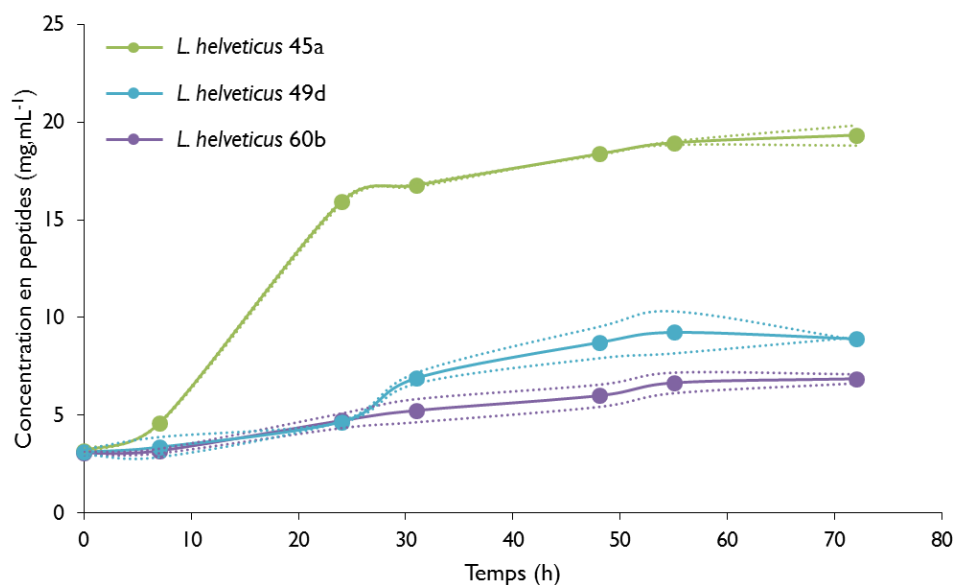


Figure 56 : Production de peptides par les souches bactériennes au cours de la fermentation du lait en mode batch.

Evolution de la concentration peptidique en fonction du temps dans les cultures des souches *L. helveticus* 45a (en vert), *L. helveticus* 49d (en violet) et *L. helveticus* 60b (en bleu clair). Les peptides produits ont été quantifiés par un dosage au réactif de Folin. La concentration peptidique est représentée par la moyenne de deux fermentations indépendantes (courbes pointillées).

Afin d'évaluer l'avancée de l'hydrolyse des protéines au cours de la fermentation, les surnageants de culture ont été analysés par SEC. Comme il a été observé au cours de l'analyse multiparamétrique, deux régions distinctes sont retrouvées sur les chromatogrammes (**Figure 57**), une zone représentant les PHPM et une pour les PBPM.

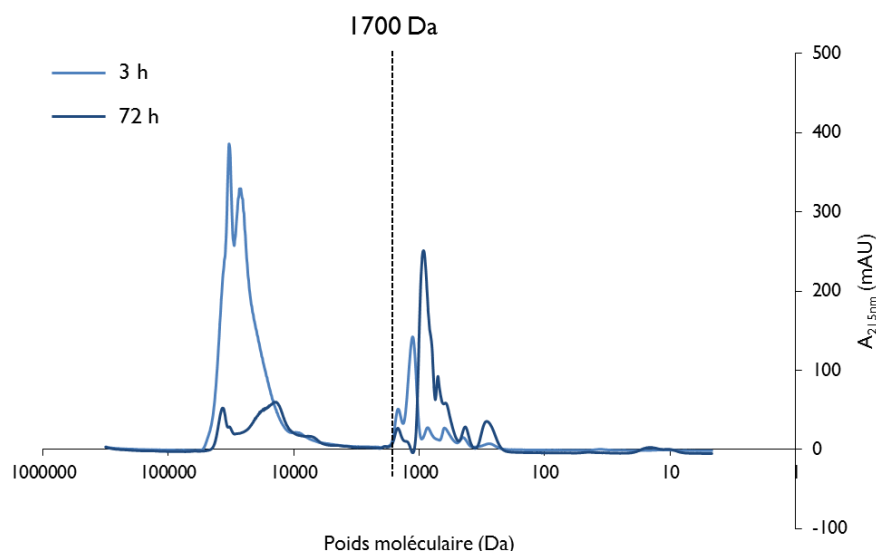


Figure 57 : Exemples de profils obtenus par SEC à partir des surnageants de culture au cours de la fermentation du lait en mode batch.

En bleu clair, le surnageant après 3 h de culture et en bleu foncé, le surnageant après 72 h de culture. Les profils ont été obtenus en utilisant une colonne Superdex Peptide 10/300 GL équilibrée en milieu ACN/H₂O/TFA (30/70/0,1 % v/v/v) selon une élution isocratique à un débit de 0,5 mL.min⁻¹.

Ces deux régions ont été intégrées séparément et rapportées à l'aire totale du chromatogramme afin d'évaluer leur répartition au cours de la fermentation. Au début de la fermentation, la proportion en PHPM est d'environ 85-86 % pour une proportion en PBPM comprise entre 15 et 20 % (**Figure 58**). Cette part de PBPM va ensuite augmenter au cours de la fermentation pour toutes les souches étudiées et en conséquence, les proportions de PHPM diminuent au cours du temps. La plus importante part de PBPM est retrouvée pour la souche *L. helveticus* 60b atteignant 71,80 % de l'aire totale du chromatogramme, suivie de la souche *L. helveticus* 45a avec 66,97 %. La souche *L. helveticus* 49d entraîne une plus faible production de PBPM (28,36 % de l'aire totale du chromatogramme) en fin de fermentation. Les résultats obtenus au cours de la fermentation montrent des profils d'hydrolyse des protéines laitières différents selon les souches bactériennes étudiées.

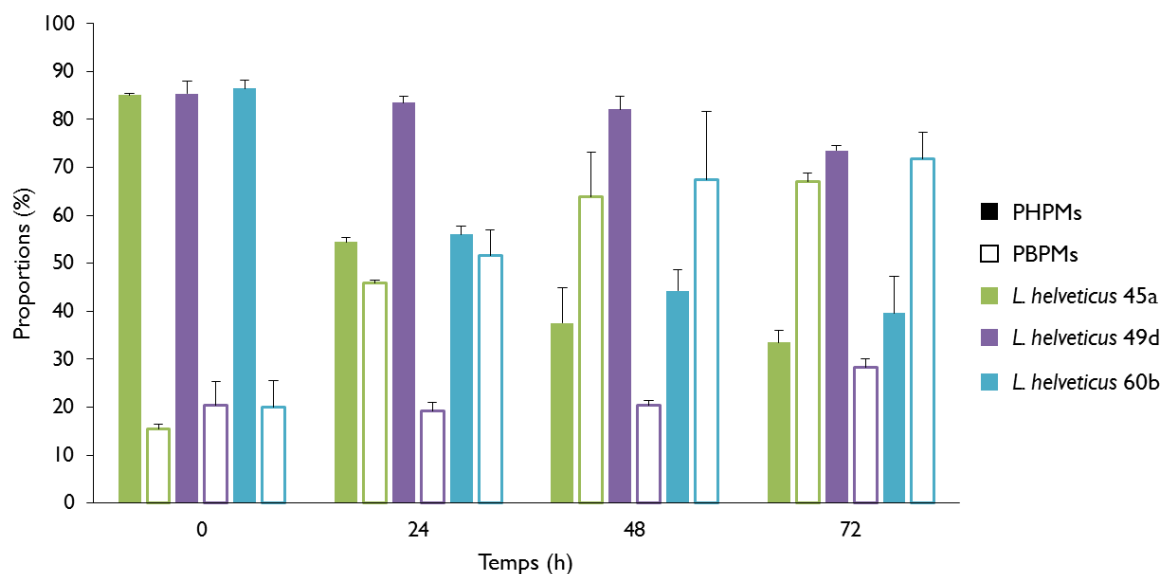


Figure 58 : Intégration différentielle des chromatogrammes obtenus après analyse par SEC des surnageants de culture au cours de la fermentation.

Les intégrations ont été réalisées selon deux régions du chromatogramme : les PHPMs (histogrammes pleins) et les PBPMs (histogrammes vides). Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'aire totale du chromatogramme : la souche *L. helveticus* 45a (en vert), la souche *L. helveticus* 49d (en violet) et la souche *L. helveticus* 60b (en bleu clair).

4. Traitements et analyses des fermentats produits

Après fermentation, les fermentats (F) sont centrifugés afin d'éliminer toutes cellules bactériennes. Un échantillon contrôle lait, constitué du milieu de culture de base, est également réalisé. Au total, 4 produits ou fermentats sont obtenus après cette étape. Les concentrations en peptides ont été déterminées dans ces 4 produits et s'échelonnent de 2,91 g.L⁻¹ pour l'échantillon contrôle à 18,4 g.L⁻¹ pour le fermentat de la souche *L. helveticus* 45a (**Figure 59**).

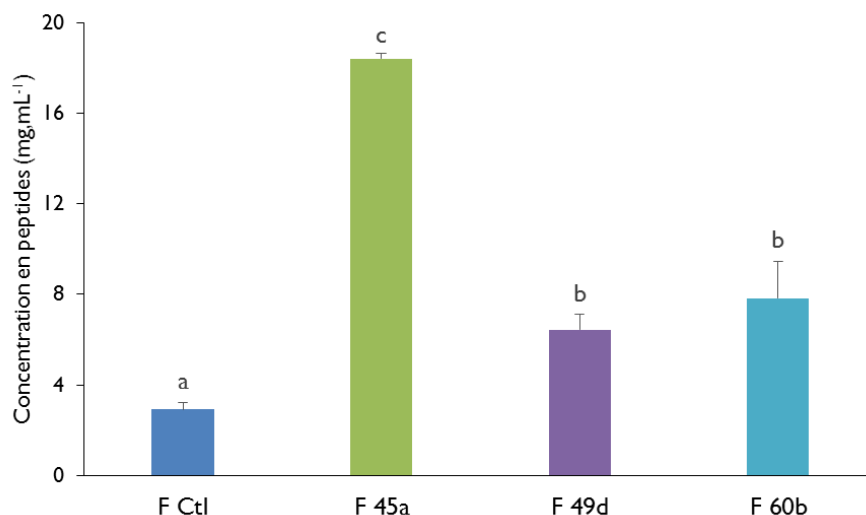


Figure 59 : Concentrations peptidiques déterminées dans les 3 produits de fermentation (F45a, F49d et F60b) et dans le produit contrôle (FCtl).

Les concentrations en peptides ont été déterminées par un dosage au réactif de Folin-Ciocalteu. * Les moyennes $\pm$ écart type ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tukey (p value < 0,05).

La concentration en matière sèche a été évaluée et est égale à 10 % ($\pm$ 0,5 %) dans les 4 produits. L'objectif suivant a été de mesurer l'impact d'une DGI simulée *in vitro* sur les populations peptidiques. Pour ce faire, deux stratégies d'analyse ont été adoptées à partir des produits de fermentation (**Figure 60**). La première consiste à digérer les fermentâts en l'état (F Brut) afin de simuler une DGI *in vitro* puis d'étudier l'activité biologique des hydrolysats. La seconde stratégie est identique sauf que les fermentâts subissent au préalable une ultrafiltration afin d'éliminer les protéines restantes. Les perméâts d'ultrafiltration (F UFP), contenant les peptides produits dans les fermentâts, subiront ensuite une DGI simulée avant d'évaluer les activités biologiques.

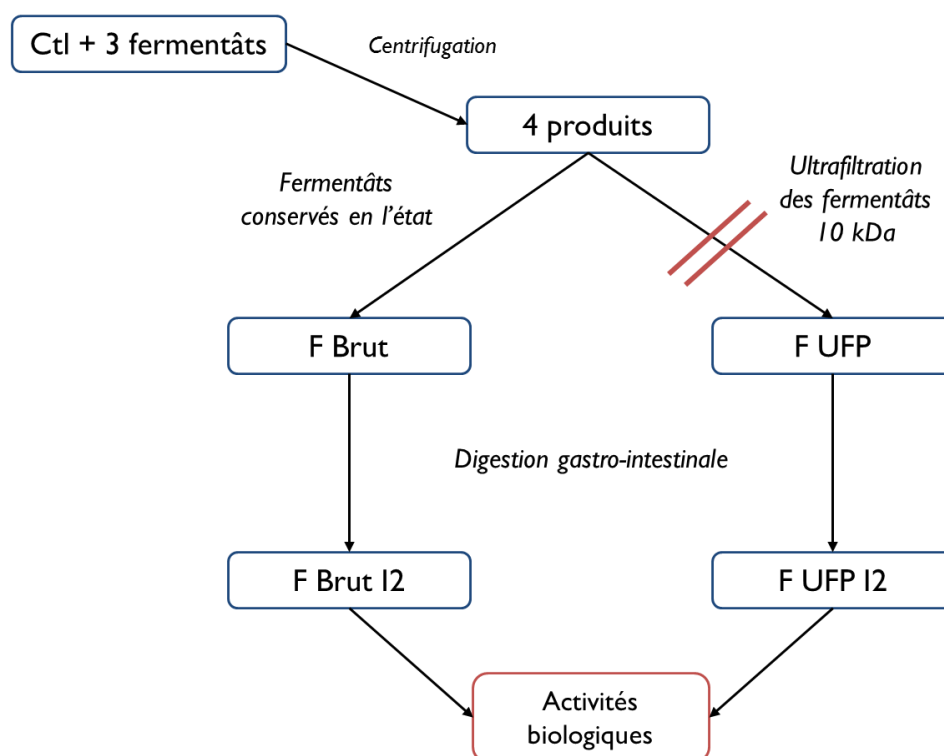


Figure 60 : Représentation schématique des stratégies entreprises pour l'étude des activités biologiques des produits fermentés.

Les 4 produits ont été conservés en l'état (F Brut) puis ont subi une digestion gastro-intestinale simulée (F Brut I2). Une stratégie alternative consiste à réaliser une ultrafiltration des fermentâts et à conserver le perméat (F UFP) pour ensuite réaliser l'étape de digestion (F UFP I2). Dans tous les cas, les activités biologiques ont été évaluées après digestion gastro-intestinale des produits.

4.1. Séparation des peptides par ultrafiltration

Une partie des fermentâts produits a subi une ultrafiltration (seuil de coupure à 10 kDa) afin d'éliminer les protéines non hydrolysées d'une masse moléculaire supérieure à 10 kDa. La purification des peptides a été confirmée par SEC (**Figure 61**), en effet les profils peptidiques obtenus montrent que les hydrolysats contiennent uniquement des peptides de poids moléculaires apparents inférieurs à 1.700 Da (PBPM), ce qui prouve la rétention des protéines par la membrane d'ultrafiltration.

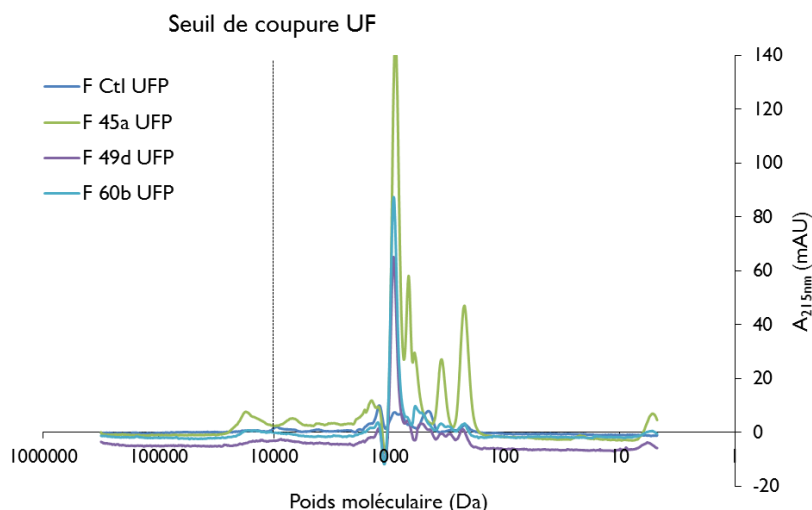


Figure 61 : Profils obtenus par SEC à partir des perméats d'ultrafiltration des différents produits de fermentation.

Chromatogrammes relatifs au produit contrôle (en bleu), au produit obtenu avec la souche *L. helveticus* 45a (en vert), au produit obtenu avec la souche *L. helveticus* 49d (en violet) et au produit obtenu avec la souche *L. helveticus* 60b (en bleu clair). Le seuil de coupure de la membrane d'ultrafiltration (10 000 Da) a été représenté. Les profils ont été obtenus en utilisant une colonne Superdex Peptide 10/300 GL équilibrée en milieu ACN/H₂O/TFA (30/70/0,1 % v/v/v) selon une élution isocratique à un débit de 0,5 mL.min⁻¹.

Du fait de la faible concentration en peptides dans les perméats d'ultrafiltration, ces produits ont été concentrés par évaporation partielle. Les concentrations en matière sèche avant et après évaporation ont été déterminées (**Tableau 20**).

Tableau 20 : Concentrations en matière sèche après évaporation des perméats d'ultrafiltration obtenus à partir des produits fermentés.

Produit	Matière sèche (% p/v)
F Ctl UFP	50,4 %
F 45a UFP	55,5 %
F 49d UFP	60,3 %
F 60b UFP	60,5 %

4.2. Digestion gastro-intestinale des produits de fermentation

Une DGI simulée *in vitro* a été réalisée sur les produits de fermentation, ceci afin d'obtenir les peptides qui auront un réel impact au niveau intestinal. Les échantillons issus des différentes phases de la digestion (gastrique, G2 et intestinale, I2) ont été analysés par SEC pour observer l'évolution de la répartition des poids moléculaire des protéines/peptides au cours de la DGI. Les concentrations peptidiques au début et à la fin de la digestion ont également été déterminées. Dans chaque cas, la DGI est réalisée à partir de 2 g de matière sèche de produit de fermentation.

La concentration peptidique a très peu évolué au cours de la DGI pour les fermentâts ayant subis une ultrafiltration (F UFP) (**Figure 62**).

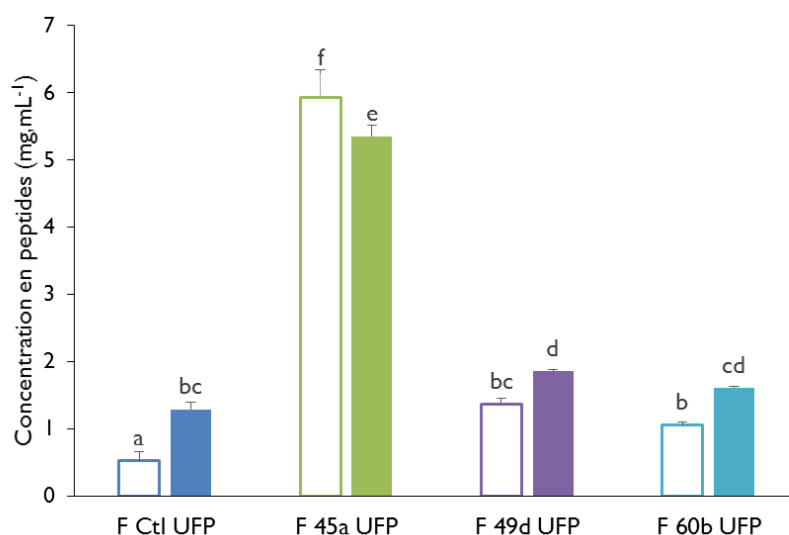


Figure 62 : Impact d'une digestion gastro-intestinale sur les concentrations peptidiques déterminées dans les perméats d'ultrafiltration des produits fermentés.

Les concentrations ont été déterminées par un dosage au réactif de Folin-Ciocalteu avant (histogrammes vides) et après (histogrammes pleins) une digestion gastro-intestinale simulée.

* Les moyennes $\pm$ écart type ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tukey (p value $< 0,05$).

On observe un enrichissement en peptides pour les fermentâts FCtl, F49d et F60b UFP et une diminution de la concentration peptidique pour le F45a UFP avec une différence maximale de $0,7 \text{ g.L}^{-1}$ de peptides entre le début et la fin de la DGI (F UFP I2). Les profils obtenus par SEC montrent également la faible évolution du contenu peptidique au cours de la DGI pour l'ensemble des fermentâts bactériens excepté pour le FCtl UFP où un léger enrichissement est observé après la phase intestinale (**Figure 63**).

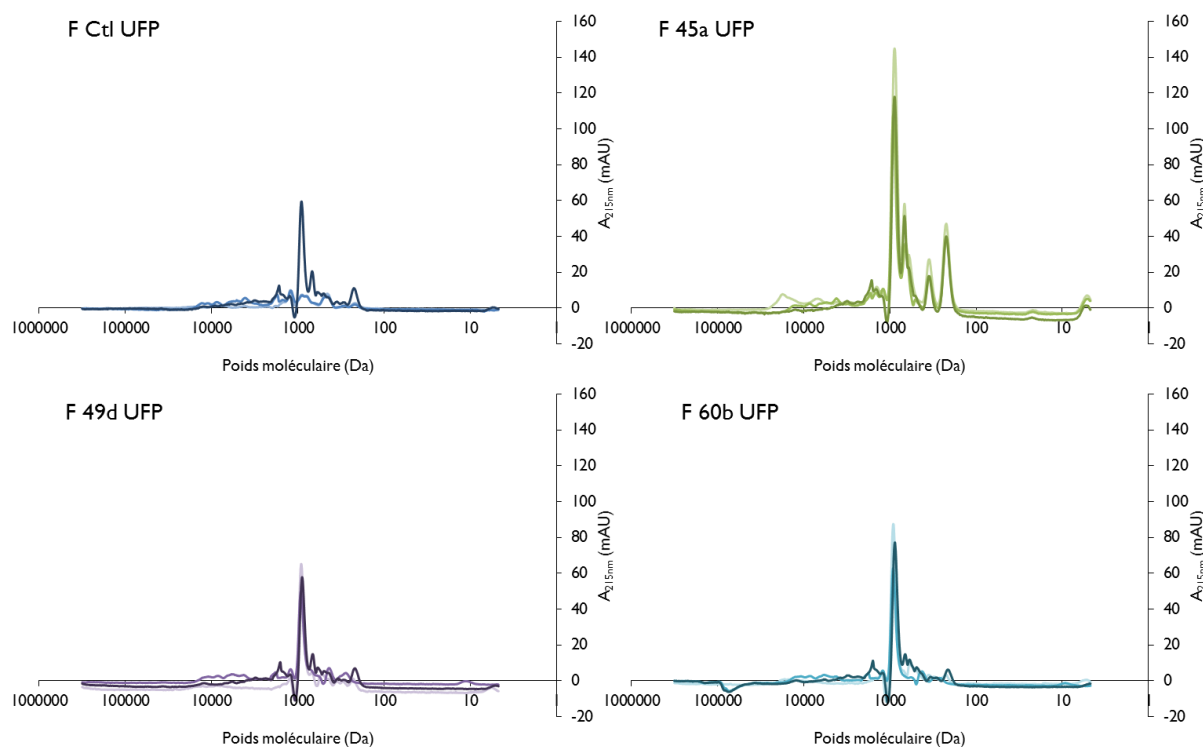


Figure 63 : Profils obtenus par SEC au cours de la digestion gastro-intestinale des produits issus de l'ultrafiltration des fermentâts.

Les produits ont été analysés avant la digestion, en fin de phase gastrique et en fin de phase intestinale (chromatogramme du plus clair au plus foncé). Chromatogrammes relatifs au produit contrôle (en bleu), au produit obtenu avec la souche *L. helveticus* 45a (en vert), au produit obtenu avec la souche *L. helveticus* 49d (en violet) et au produit obtenu avec la souche *L. helveticus* 60b (en bleu clair). Les profils ont été obtenus en utilisant une colonne Superdex Peptide 10/300 GL équilibrée en milieu ACN/H₂O/TFA (30/70/0,1 % v/v/v) selon une élution isocratique à un débit de $0,5 \text{ mL.min}^{-1}$.

A l'inverse, la DGI *in vitro* des fermentâts bruts (F Brut) conduit à une nette modification du contenu peptidique, en effet l'action des enzymes digestives sur les protéines entraîne un enrichissement important de la concentration en peptides dans les produits finaux (F Brut I2) (**Figure 64**).

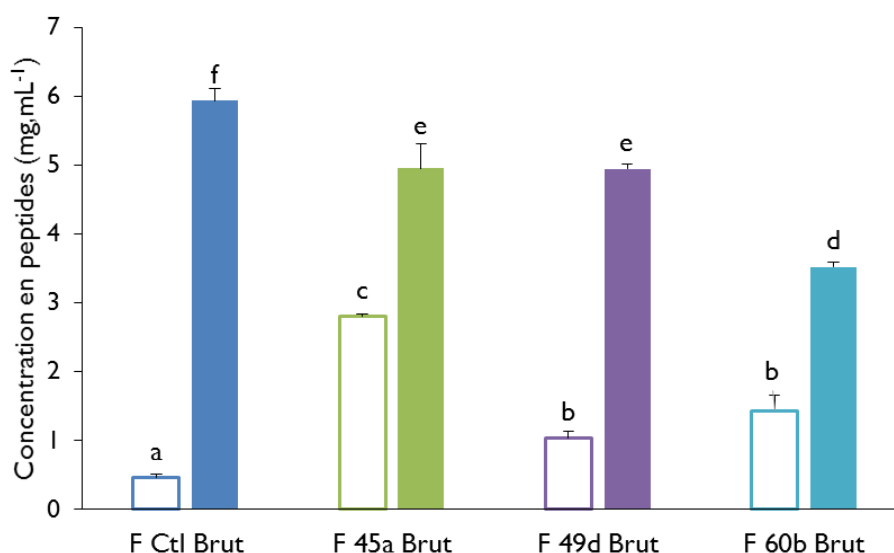


Figure 64 : Impact d'une digestion gastro-intestinale sur les concentrations peptidiques déterminées dans les produits fermentés bruts.

Les concentrations ont été déterminées par un dosage au réactif de Folin-Ciocalteu avant (histogrammes vides) et après (histogrammes pleins) une digestion gastro-intestinale simulée. * Les moyennes $\pm$ écart type ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tukey (p value $< 0,05$).

La concentration en peptide dans le F Ctl Brut I2 ($5,93 \text{ g.L}^{-1}$) est presque 15 fois supérieure à celle de début de digestion et est la concentration la plus élevée des 4 produits testés. Pour les fermentâts bactériens, l'enrichissement en peptides après DGI est moindre comparé au contrôle, les concentrations étant de 2 à 5 fois supérieures entre le début et la fin de la digestion. Les concentrations finales sont respectivement de 4,95, 4,94 et $3,96 \text{ g.L}^{-1}$ pour les fermentâts F45a, F49d et F60b Brut I2. De la même manière, les profils peptidiques obtenus par SEC évoluent nettement au cours de la DGI en comparaison des fermentâts F UFP (**Figure 65**). Au fur et à mesure de la DGI, les enzymes digestives hydrolysent les protéines/peptides présents dans les F Brut produisant de nouveaux peptides.

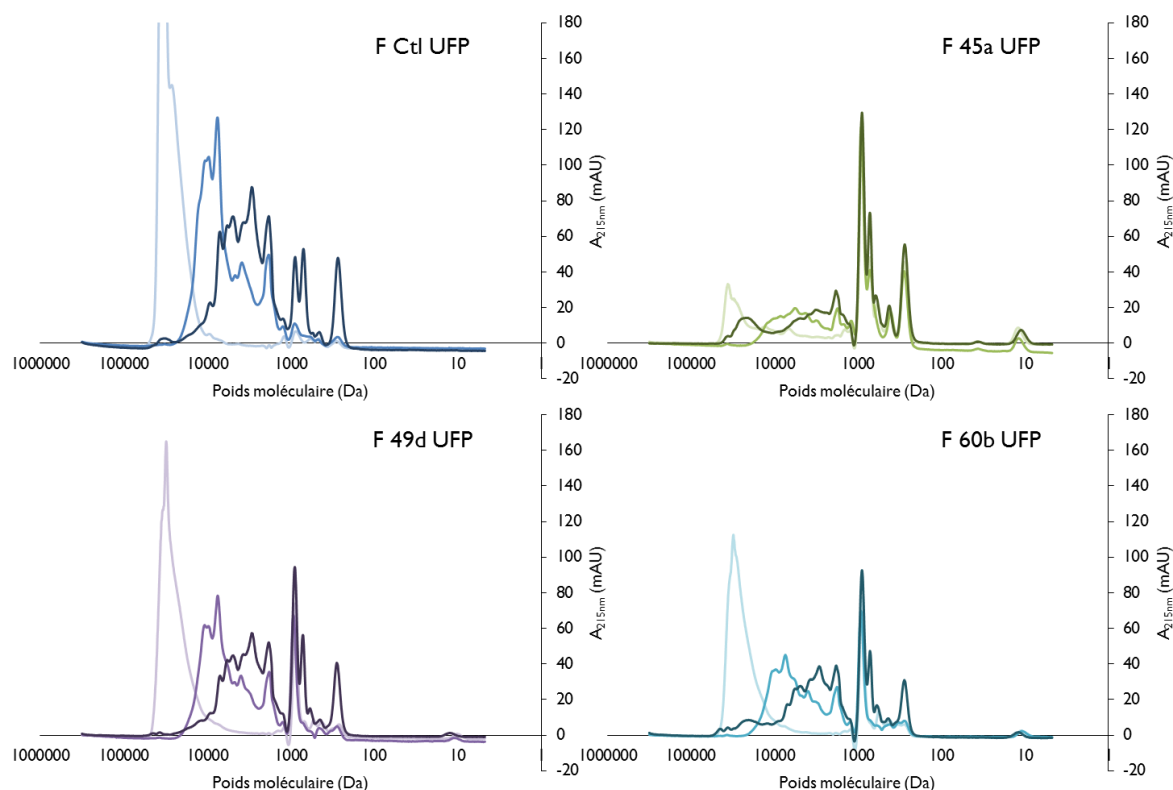


Figure 65 : Profils peptidiques obtenus par SEC au cours de la digestion gastro-intestinale des produits fermentés bruts.

Les produits ont été analysés avant la digestion, en fin de phase gastrique et en fin de phase intestinale (chromatogramme du plus clair au plus foncé). Chromatogrammes relatifs au produit contrôle (en bleu), au produit obtenu avec la souche *L. helveticus* 45a (en vert), au produit obtenu avec la souche *L. helveticus* 49d (en violet) et au produit obtenu avec la souche *L. helveticus* 60b (en bleu clair). Les profils ont été obtenus en utilisant une colonne Superdex Peptide 10/300 GL équilibrée en milieu ACN/H₂O/TFA (30/70/0,1 % v/v/v) selon une élution isocratique à un débit de 0,5 mL.min⁻¹.

4.3. Impact de la digestion gastro-intestinale sur l'hétérogénéité peptidique

Les peptides présents dans les échantillons F Brut et F Brut I2 ont été extraits et identifiés par chromatographie sur colonne C18 couplée à la spectrométrie de masse afin d'évaluer l'hétérogénéité des peptides produits par les différentes fermentations ainsi que l'évolution de cette hétérogénéité au cours de la DGI. Ces travaux n'ont pas été réalisés à partir des échantillons F UFP et F UFP I2 à cause du faible nombre de peptides identifiés dans ces échantillons. La recherche d'identité des peptides par base de données a été conduite sur l'ensemble des protéines bovines issues de la base de données Uniprot afin d'identifier les peptides laitiers. Elle a également été conduite à partir de bases de données de protéines relatives à *L. helveticus* et aux levures (présents initialement au début de la fermentation) afin de vérifier que les peptides majoritaires présents dans les échantillons sont bien issus des protéines laitiers. Les recherches d'identité des peptides ont conduit à des taux d'identification

très faibles voire nuls concernant les microorganismes suggérant une absence de peptides issus des souches bactériennes ou de l'extrait de levure dans les échantillons.

Le nombre de séquences peptidiques très majoritairement bovines identifiées dans les F Brut varie de 85 pour le Fctl à 317 pour le F49d (**Tableau 21 et Tableau, Annexe 2**).

Tableau 21 : Nombres de séquences peptidiques identifiées par spectrométrie de masse dans les produits fermentés bruts avant et après digestion gastro-intestinale.

Fermentât	Brut	I2
F Ctl	85	511
F 45a	105	283
F 49d	317	471
F 60b	92	451

Après DGI des fermentâts, ce nombre augmente pour tous les produits de fermentation, allant de 283 pour le F45a à 511 pour le Fctl. Les peptides présents dans les échantillons sont issus majoritairement issus des caséines β , α_{s1} , α_{s2} et κ ainsi que de la β lactoglobuline et de l' α lactalbumine (**Tableau 22**).

Tableau 22 : Nombres moyens de séquences peptidiques identifiées par spectrométrie de masse dans les produits fermentés bruts avant et après digestion gastro-intestinale pour les protéines majoritaires du lait et la pepsine gastrique.

Avant digestion gastro-intestinale (Brut)							
Fermentat	Caséine β	Caséine α_{s1}	Caséine α_{s2}	Caséine κ	β -lactoglobuline	α -lactalbumine	Pepsine
F Ctl	23	30	0	12	0	0	0
F 45a	59	31	0	4	0	0	0
F 49d	151	78	10	27	0	0	0
F 60b	47	18	3	12	0	0	0
Après digestion gastro-intestinale (I2)							
Fermentat	Caséine β	Caséine α_{s1}	Caséine α_{s2}	Caséine κ	β -lactoglobuline	α -lactalbumine	Pepsine
F Ctl	143	84	32	39	78	10	44
F 45a	49	12	6	18	83	16	49
F 49d	126	63	20	45	80	17	47
F 60b	108	45	15	42	89	17	53

Des peptides issus de la pepsine dans les produits digérés en raison de l'auto-hydrolyse des enzymes digestives sont également identifiés. Dans les produits bruts, des peptides provenant des caséines β et α_{s1} ont été identifiés et comme attendu, la diversité des peptides augmente après digestion mettant en évidence l'action des enzymes digestives. Ainsi pour tous les échantillons, des peptides issus de toutes les protéines majoritaires du lait et de la pepsine sont

identifiés. Curieusement, la fermentation ne semble pas avoir impacté l'hydrolyse de la β lactoglobuline car aucun peptide n'est identifié comme issu de cette protéine dans les F Brut. Seules les enzymes digestives hydrolysée cette protéine comme en témoigne le nombre de séquences peptidiques identifiées dans les F Brut I2.

Afin de comparer les produits de fermentation entre eux, les séquences peptidiques issues de ces fermentats ont été comparées aux séquences peptidiques du contrôle lait. Dans les fermentats bruts, la proportion de peptides communs à ceux du contrôle lait varie de 6,45 à 22,5 % (**Figure 66**).

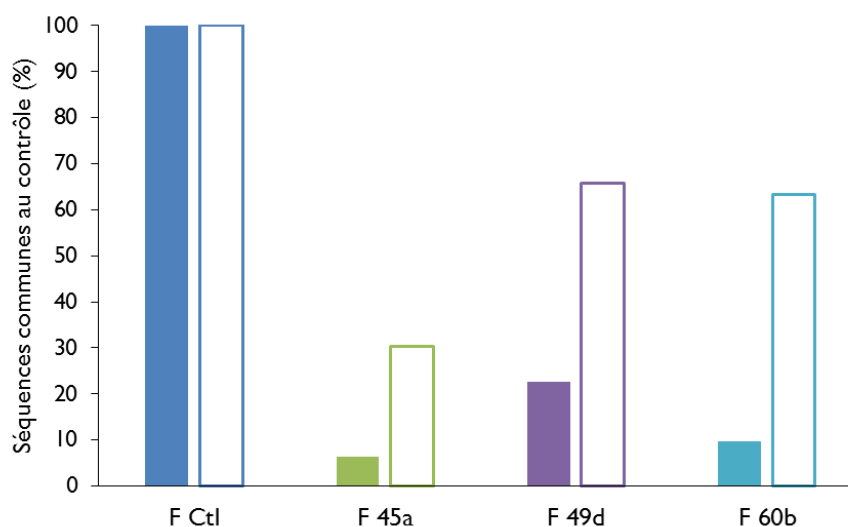


Figure 66 : Proportions de séquences peptidiques communes à la condition contrôle dans les produits fermentés bruts.

Les séquences identifiées par spectrométrie de masse dans la condition contrôle (FCtl) ont été prises pour références (100 %). Les comparaisons ont été réalisées entre les produits avant (histogrammes pleins) et après (histogrammes vides) la digestion gastro-intestinale.

Ainsi, le F49d Brut est le produit le plus proche du contrôle lait en termes de séquences peptidiques communes tandis que le F45a Brut en est le plus éloigné. Cependant, la DGI tend à augmenter le nombre de peptides communs aux différents hydrolysats. En effet, la proportion de séquences du contrôle lait retrouvée dans les fermentats est cette fois comprise entre 30,4 et 65,8 % avec toujours le F49d, caractérisé comme le produit ayant le plus de séquences peptidiques communes avec le contrôle lait et le F45a en ayant le moins. Ces résultats comparatifs illustrent donc parfaitement l'impact de la fermentation de l'hétérogénéité peptidique que ce soit avant ou à la suite de la DGI et que même si la DGI tend à réduire l'hétérogénéité peptidique, elle n'y parvient pas totalement. En d'autres termes, une part de l'hétérogénéité est spécifique au processus de fermentation et aux souches.

Pour aller plus loin dans la comparaison des produits, les cartes de chaleur de la caséine β ont été réalisées et comparées par une ACP. Pour rappel, la caséine β a été choisie du fait du nombre majeur de séquences peptidiques identifiées à la fois dans les produits brut et les produits digérés. Les composantes principales 1 et 2 du graphe des individus (**Figure 67**) expliquent respectivement 44,85 et 26,11 % de la variance totale.

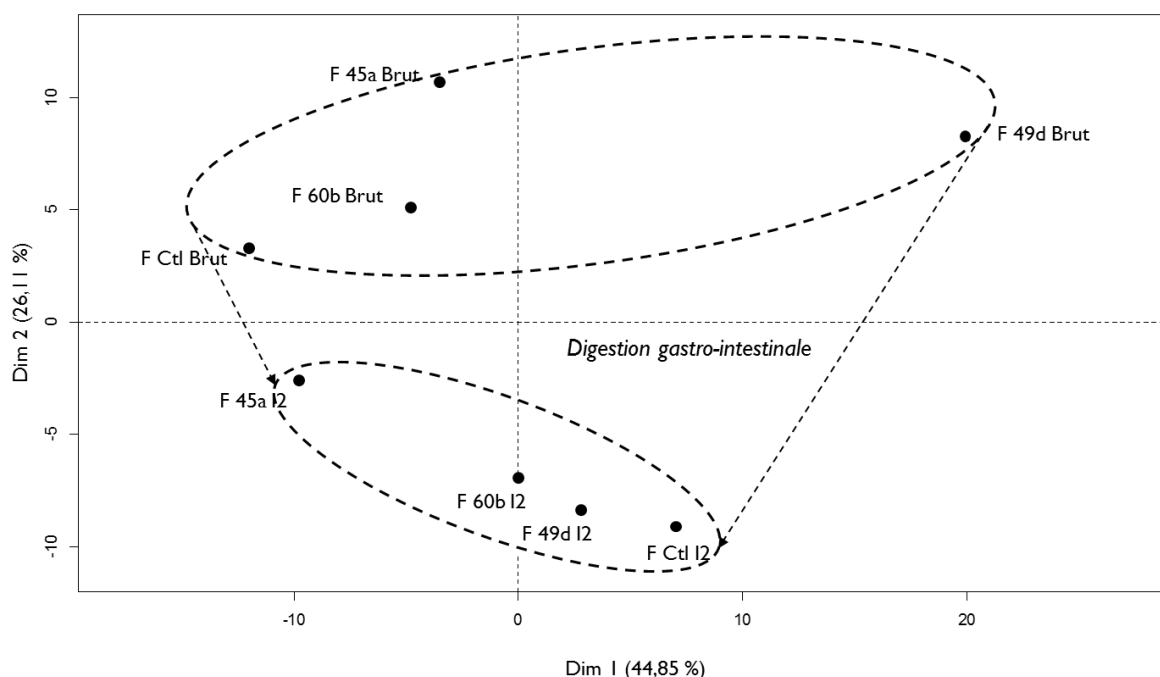


Figure 67 : Analyse en composantes principales des cartes de chaleur de la caséine β construites à partir des peptides identifiés dans les produits de fermentation.

Graphe des individus représentant les 4 produits avant (Brut) et après (I2) digestion gastro-intestinale en fonction des dimensions créées (Dim 1 et Dim 2). Les cercles illustrent la variabilité entre les produits bruts et les produits digérés.

Tous les échantillons sont répartis sur l'ensemble de la dimension 1, mais les échantillons F Brut sont regroupés sur la partie positive de la dimension 2, tandis que les produits F Brut I2 sont retrouvés dans la partie négative de cet axe. La variabilité entre les échantillons (mise en évidence par les cercles sur la figure) est supérieure pour les échantillons bruts que pour les échantillons digérés. Ceci illustre l'impact de la DGI sur l'homogénéisation des 4 produits notamment la réduction de l'hétérogénéité peptidique des fermentats par rapport au contrôle lait. Après digestion, il a également été remarqué que le F45a était le plus éloigné du contrôle en ce qui concerne les séquences issues de la caséine β . Ceci, probablement en raison de l'importante capacité de la souche bactérienne à produire des peptides au cours de la fermentation.

De la même manière, le logiciel Progenesis Q1p a été utilisé afin de comparer les produits de fermentation entre eux. Ce logiciel réalise une ACP à partir des données de temps de rétention chromatographique et de spectrométrie de masse obtenues après analyse. Les composantes principales 1 et 2 du graphe des individus (**Figure 68**) expliquent respectivement 20,08 et 15,02 % de la variance totale.

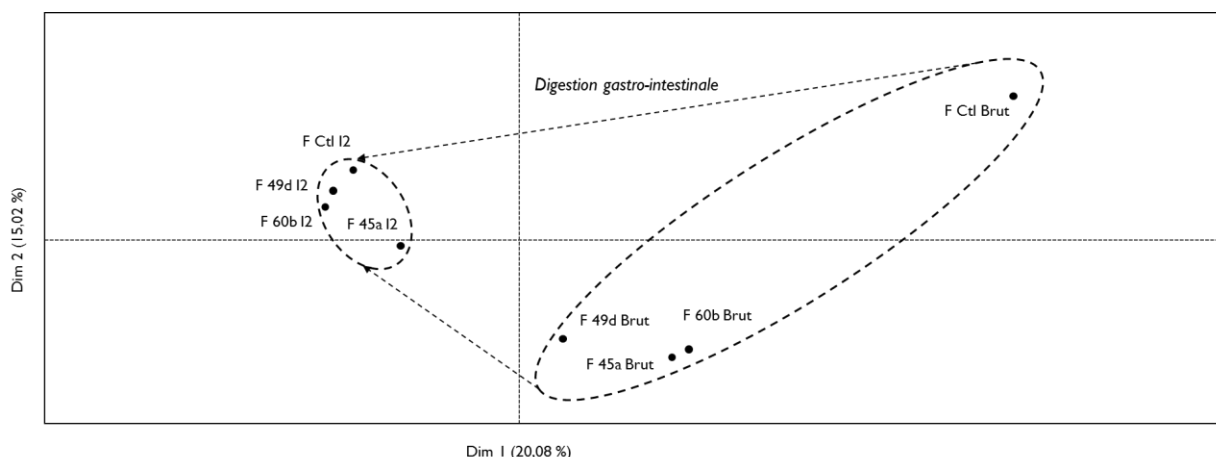


Figure 68 : Analyse en composantes principales issue de la comparaison des cartes peptidiques obtenues par spectrométrie de masse.

Graphique des individus obtenu par le logiciel Progenesis représentant les 4 produits avant (Brut) et après (I2) digestion gastro-intestinale en fonction des dimensions créées (Dim 1 et Dim 2). Les cercles illustrent la variabilité entre les produits bruts et les produits digérés.

Les échantillons bruts sont répartis sur la partie positive de la dimension 1 et les échantillons digérés sur la partie négative de l'axe. La variabilité entre les échantillons F Brut est supérieure à la variabilité observée pour les échantillons digérés, ce qui démontre une nouvelle fois l'impact de la DGI sur la réduction de l'hétérogénéité des produits de fermentation qui est ici plus marquée. Selon cette représentation, le produit F45a I2 est toujours le plus éloigné du F Ctl I2.

L'ensemble des analyses réalisées dans cette partie montre que malgré les différences constatées au niveau des séquences peptidiques entre les produits fermentés et le contrôle lait, la DGI semble lisser l'hétérogénéité peptidique des produits entre eux, rendant ainsi en termes de contenu peptidique, les fermentats bactériens plus proche du lait.

4.4. Prédiction des séquences bioactives dans les produits digérés.

Une approche bio-informatique a été conduite afin de prédire l'activité biologique potentielle des fermentâts avant et après digestion. Les activités biologiques ciblées dans cette partie sont l'inhibition des activités enzymatiques de la DPP-IV et de l'ACE. Les séquences peptidiques ont d'abord été comparées à la base de données MBPDB pour la recherche de peptides déjà connus comme bioactifs. Parallèlement, des modèles QSAR ont été utilisés afin de prédire l'activité biologique potentielle des peptides identifiés.

La recherche dans la base de données MBPDB a conduit à la mise en évidence de différents peptides bioactifs présents dans les produits de fermentation. Les fermentâts bactériens contiennent entre 8,6 et 20 % de séquences bioactives tandis que le contrôle lait en contient 12 % (**Tableau 23 et Tableau, Annexe 2**). Les peptides en question présentent plusieurs activités biologiques d'intérêt comme l'inhibition de l'ACE, de la DPP-IV, des activités anti-oxydantes, anti-cancéreuses, antimicrobiennes, opioïdes ou d'immunomodulation.

Tableau 23 : Nombres de séquences bioactives selon la base de données MBPDB dans les différents produits de fermentation bruts et digérés.

Fermentât	Brut (%)	I2 (%)
F Ctl	12	10
F 45a	8,6	8,9
F 49d	10	11
F 60b	20	10

On dénombre jusqu'à 7 séquences peptidiques connues comme inhibitrices de la DPP-IV dans les produits Fctl, F49d et F60b Brut I2 dont certaines sont propres aux fermentations par les souches bactériennes (**Figure 69**). Seuls 4 séquences sont retrouvées pour le F45a Brut I2.

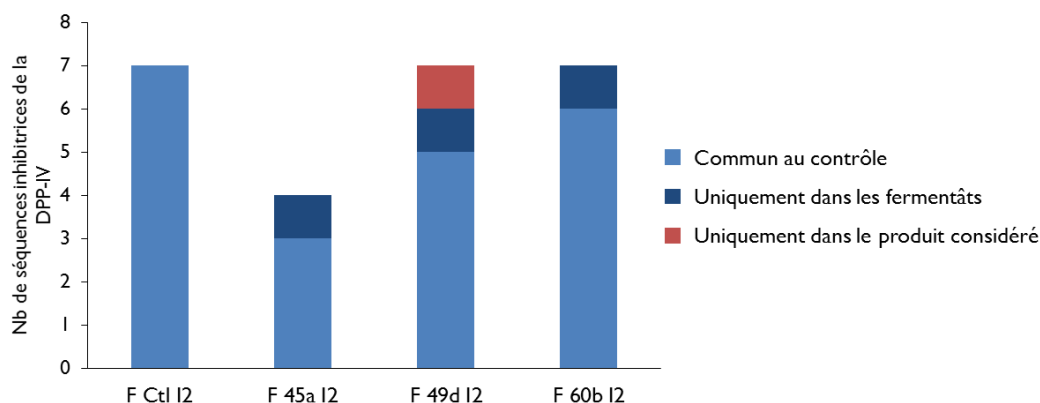


Figure 69 : Nombre de séquences inhibitrices de la DPP-IV dans les différents produits bruts après digestion selon la base de données MBPDB.

En bleu clair, les séquences communes à la condition contrôle (FCtl I2), en bleu foncé les séquences retrouvées dans au moins 2 fermentats bactériens et en rouge la séquence uniquement retrouvée dans un produit donné.

Concernant l'inhibition de l'ACE, un certain nombre de séquences bioactives sont présentes dans les produits bruts après digestion (Brut I2) (**Figure 70A**), 17 pour le FCtl, 16 pour le F49d, 15 pour le F60b et 8 pour le F45a avec une importante proportion de peptides présents à la fois dans le contrôle lait et dans les fermentats bactériens. Cependant, avant DGI, cette proportion est moindre puisque seulement 2 peptides inhibiteurs de l'ACE sont retrouvés dans le FCtl (**Figure 70B**). Ces 2 mêmes peptides sont présents dans les fermentats bactériens ainsi que des peptides produits par l'action des souches bactériennes. Au total, 4 peptides inhibiteurs de l'ACE sont présents dans le F45a Brut, 5 dans le F60b Brut et 13 dans le F49d Brut dont 8 sont retrouvés uniquement dans ce fermentât et sont donc générés exclusivement par la souche.

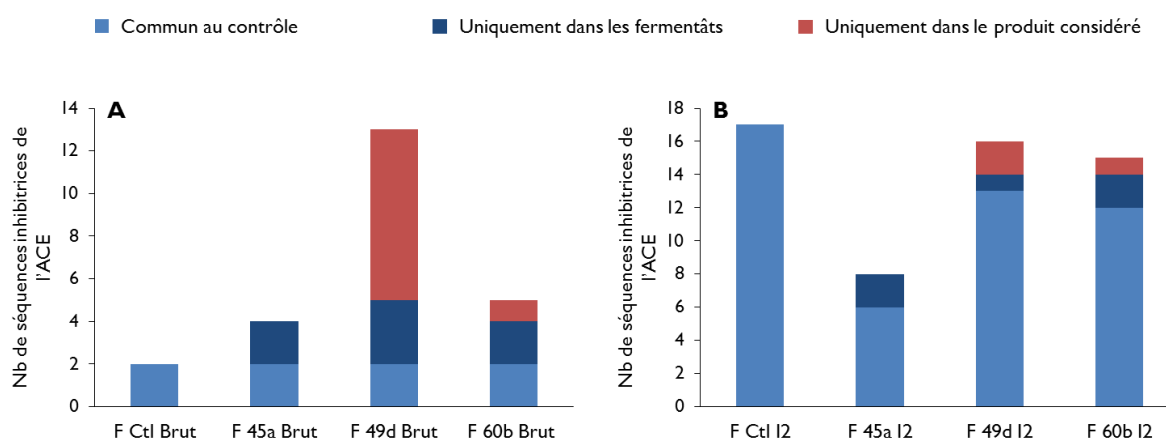


Figure 70 : Nombres de séquences inhibitrices de l'ACE dans les différents produits selon la base de données MBPDB.

A : comparaison par alignement des séquences issues des produits fermentés bruts, **B :** comparaison par alignement des séquences issues des produits fermentés ayant subi la digestion gastro-intestinale.

En bleu clair, les séquences communes à la condition contrôle (FCtl I2), en bleu foncé les séquences retrouvées dans au moins 2 fermentats bactériens et en rouge les séquences uniquement retrouvées dans un produit donné.

Concernant les inhibitions de la DPP-IV ou de l'ACE, ces résultats théoriques obtenus *in silico* montrent que les fermentâts issus des souches bactériennes et ayant subis la DGI, ne possèdent pas une activité supérieure au contrôle lait. Seuls les fermentâts non digérés montrent une proportion plus importante de peptides inhibiteurs de l'ACE par rapport au lait. Ces travaux étant basé sur des peptides déjà connus comme bioactifs, une prédiction d'activité par modèles QSAR a été réalisée à partir de l'ensemble des séquences peptidiques identifiées.

D'après le modèle QSAR utilisé pour la prédiction de peptides inhibiteurs de la DPP-IV, les peptides présents dans les échantillons ont des IC_{50} comprises entre 0 et 4000 μ M. Les séquences ont été réparties en différentes catégories en fonction de leur IC_{50} et dénombrées pour chaque fermentât. Ceci a permis de déterminer les pourcentages de peptides inhibiteurs dans chaque catégorie par rapport au nombre de séquences peptidiques totales dans le produit considéré. Concernant l'inhibition de la DPP-IV, une certaine homogénéité est observée entre les différents fermentâts digérés (Brut I2) au vu de la répartition des IC_{50} dans les séquences identifiées (**Figure 71**). Cette homogénéité est d'ailleurs observée avec le contrôle lait.

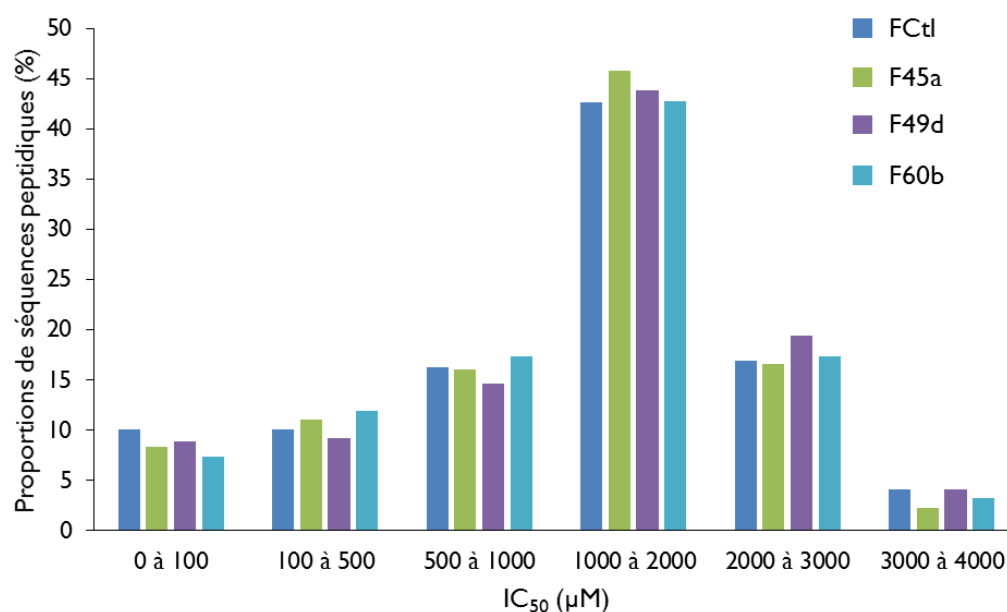


Figure 71 : Répartition des IC_{50} prédites pour les peptides identifiés dans les différents produits bruts digérés vis-à-vis de l'inhibition de la DPP-IV.

En bleu le produit contrôle, en vert le produit obtenu avec la souche *L. helveticus* 45a, en violet le produit obtenu avec la souche *L. helveticus* 49d et en bleu clair le produit obtenu avec la souche *L. helveticus* 60b. Les IC_{50} ont été prédites par un modèle QSAR d'inhibition de la DPP-IV et les proportions de chaque catégorie de peptides ont été calculées en fonction du nombre total de séquences identifiées dans le produit correspondant.

Le modèle QSAR utilisé pour la prédiction des IC_{50} des peptides issus des F Brut vis-à-vis de l'inhibition de l'ACE détermine des concentrations comprises entre 0 et 2000 μM au vu de la proportion de séquences peptidiques. Comme il a été observé pour l'inhibition de la DPP-IV, les produits ayant subi la DGI sont assez homogènes entre eux (**Figure 72A**), dont une forte proportion (environ 27 %) de peptides ayant des IC_{50} comprises entre 0 et 50 μM dans les 4 fermentâts. Cependant, la comparaison des produits non digérés a montré plusieurs différences (**Figure 72B**). Premièrement au niveau des séquences ayant des IC_{50} comprises entre 0 et 50 μM , soient les séquences prédites comme les plus inhibitrices de l'ACE, 19,3 % des peptides du FCtl sont dans cette catégorie alors que 23, 29,6 et 34,4 % des peptides issus respectivement des F60b, F49d et F45a y sont retrouvés. Cela suggère que les 3 fermentâts bactériens possèdent une plus forte proportion de séquences inhibitrices de l'ACE que le FCtl. Ce dernier présente néanmoins une plus importante proportion de peptides inhibiteurs, dans la catégorie des IC_{50} entre 50 et 100 μM , que les 3 autres produits. De manière intéressante, une absence de peptides ayant des IC_{50} prédites entre 100 et 200 μM a été remarquée dans le FCtl, alors que les 3 fermentâts en présentent de 24 à 18 %. Les variations observées entre les 4 fermentâts non digérés tendent à montrer que les fermentâts produits à partir des souches bactériennes présentent une capacité d'inhibition de l'ACE supérieure au contrôle lait.

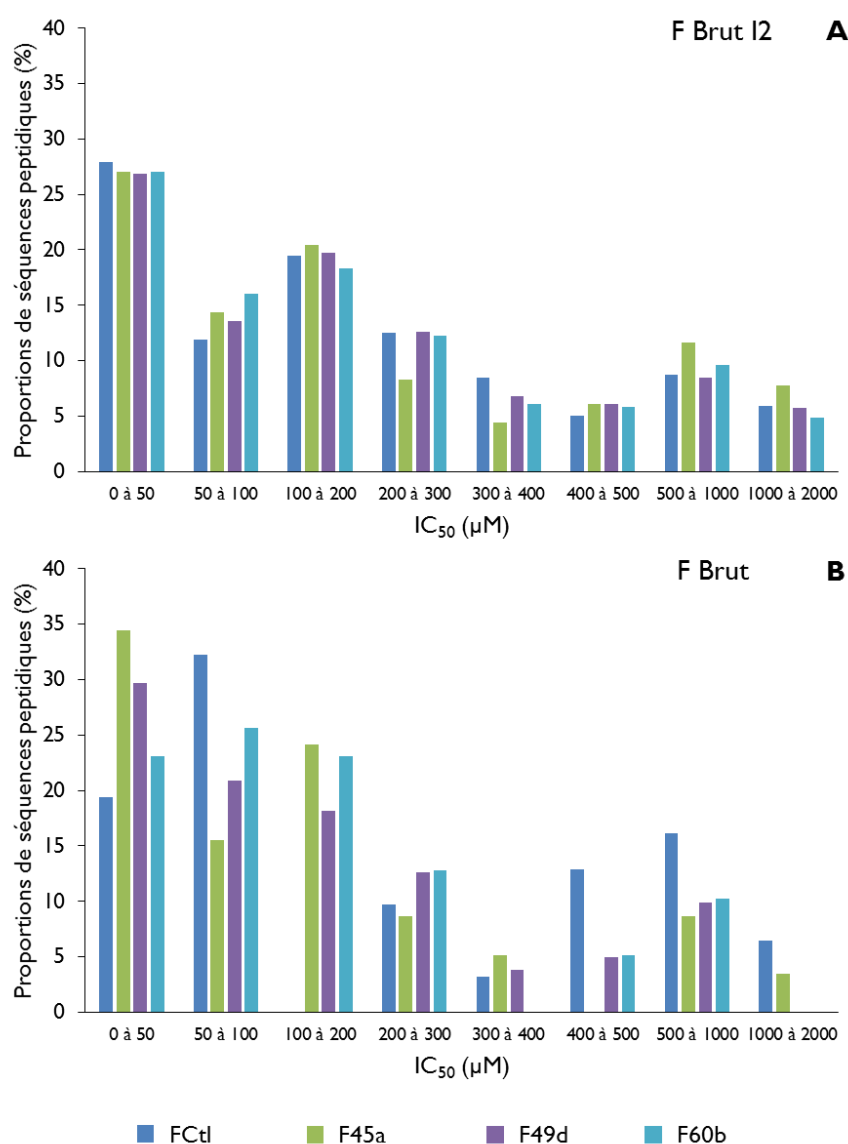


Figure 72 : Répartition des IC_{50} prédites pour les peptides identifiés dans les différents produits bruts vis-à-vis de l'inhibition de l'ACE.

A : répartition pour les produits bruts ayant subi la digestion gastro-intestinale, **B :** répartition pour les produits bruts avant digestion.

En bleu le produit contrôle, en vert le produit obtenu avec la souche *L. helveticus* 45a, en violet le produit obtenu avec la souche *L. helveticus* 49d et en bleu clair le produit obtenu avec la souche *L. helveticus* 60b. Les IC_{50} ont été prédites par un modèle QSAR d'inhibition de l'ACE et les proportions de chaque catégorie de peptides ont été calculées en fonction du nombre total de séquences identifiées dans le produit correspondant.

5. Mesure *in vitro* des activités biologiques des hydrolysats

Afin d'étudier les potentielles activités des produits de fermentation et de confirmer les prédictions réalisées à partir des séquences peptidiques identifiées, différentes activités biologiques ont été mesurées dans les fermentâts (produits Brut et Brut I2 ainsi que sur leurs équivalents ayant préalablement subis une ultrafiltration (UFP et UFP I2)). Les résultats obtenus sont toujours comparés au contrôle lait (FCtl), afin de montrer l'impact de la fermentation sur l'activité considérée.

5.1. Cytotoxicité des hydrolysats peptidiques

Afin de vérifier l'absence de toxicité des produits de fermentation, la viabilité des cellules Caco-2 à confluence en présence ou non des hydrolysats a été étudiée. Ainsi, les produits ayant subis la DGI, à des concentrations de 5 et 10 g.L⁻¹, ont été mis en contact avec les cellules durant 7 et 24 h. Les résultats présentés dans la **Figure 73** montrent l'absence de cytotoxicité des fermentâts testés à 5 g.L⁻¹ que ce soit après 7 ou 24 h de contact. A la concentration de 10 g.L⁻¹, les fermentâts ne sont pas non plus toxique même si une baisse non significative de la viabilité des cellules est observée avec le produit F49d Brut I2 après 7 et 24 h de contact.

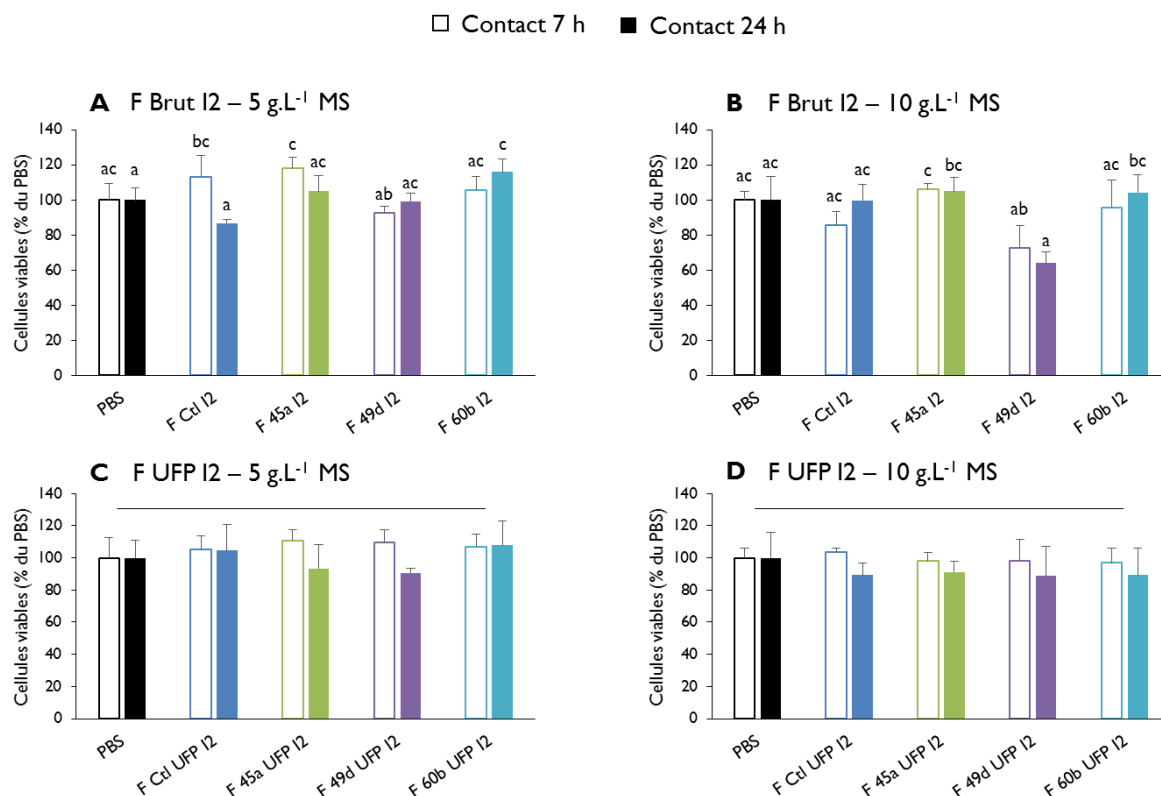


Figure 73 : Pourcentages de cellules Caco-2 viables après un contact avec les différents produits fermentés. La viabilité des cellules a été déterminée après 7 h (histogrammes vides) et 24 h de contact (histogrammes pleins). Les résultats sont exprimés en pourcentage de la condition contrôle (tampon PBS). **A :** produits bruts digérés et testés à 5 g.L⁻¹, **B :** produits bruts digérés et testés à 10 g.L⁻¹, **C :** perméats d’ultrafiltration digérés et testés à 5 g.L⁻¹, **D :** perméats d’ultrafiltration digérés et testés à 10 g.L⁻¹. *Au sein du même graphe, les moyennes ± écart type ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par ANOVA à un facteur suivie d’un test de Tukey (p value < 0,05).

5.2. Inhibition de la DPP-IV

L’impact des produits de fermentation sur l’inhibition de la DPP-IV a été évalué selon deux méthodes : un test biochimique *in vitro*, utilisant de la DPP-IV porcine purifiée, permettant la détermination des IC₅₀ des fermentâts, et un test cellulaire permettant de mesurer *in situ* l’inhibition de l’enzyme exprimée par les cellules Caco-2 en culture.

Le test biochimique d’inhibition de la DPP-IV réalisé à partir des échantillons bruts digérés (F Brut I2) a permis de calculer les IC₅₀ des 4 fermentâts. Les produits FCtl et F49d Brut I2 présentent la plus forte capacité d’inhibition de la DPP-IV avec des IC₅₀ respectives de 1,53 et 2 mg.mL⁻¹ (**Figure 74**).

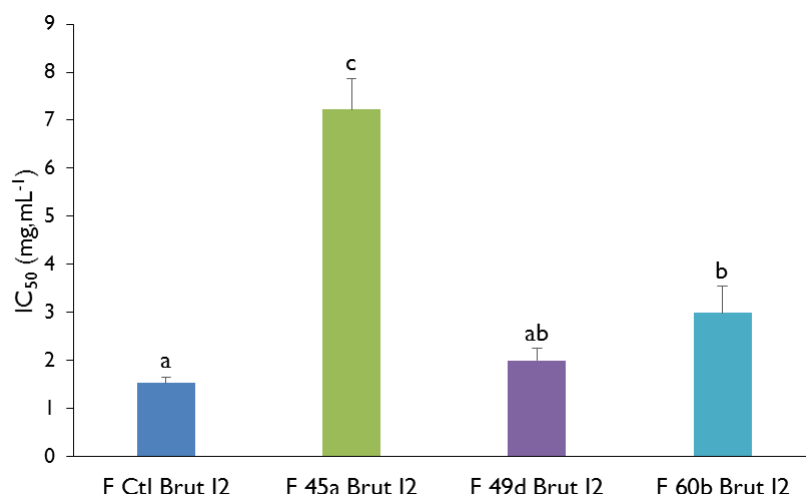


Figure 74 : Inhibition de la DPP-IV par les différents produits fermentés digérés.

L'inhibition a été déterminée par un test biochimique, les résultats sont exprimés en IC₅₀. * Les moyennes $\pm$ écart type ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tukey (p value < 0,05).

L'échantillon F60b Brut I2 possède une IC₅₀ de 3 mg.mL⁻¹ mais le F45a Brut I2 présente une IC₅₀ nettement supérieure aux autres produits avec une valeur de 7,2 mg.mL⁻¹. Concernant les produits F UFP I2, l'activité d'inhibition de la DPP-IV était trop faible pour pouvoir calculer une IC₅₀.

La **Figure 75** présente les pourcentages d'inhibition de la DPP-IV des produits après les étapes d'ultrafiltration et de DGI testés à une concentration de 15 g.L⁻¹ de matière sèche (soit la concentration maximale obtenue en fin de DGI). Ces échantillons présentent une très faible capacité d'inhibition de l'enzyme, la valeur maximale ayant été observée pour le F49d UFP I2 avec un pourcentage d'inhibition de 26,3 %.

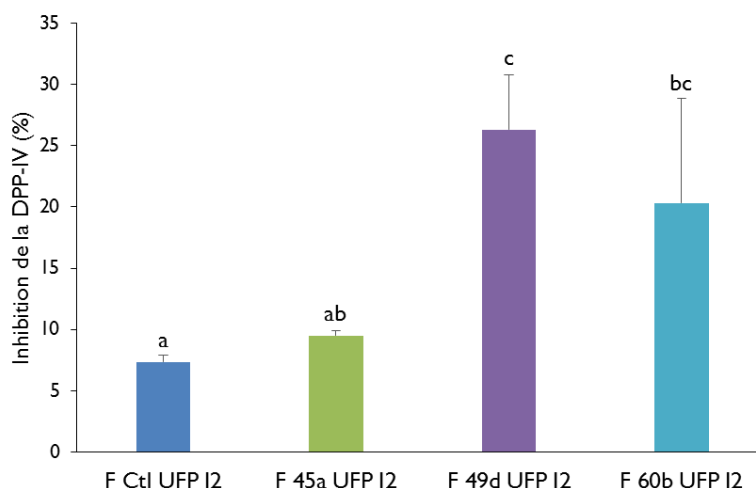


Figure 75 : Inhibition de la DPP-IV par les différents perméats d'ultrafiltration après digestion.

L'inhibition a été déterminée par un test biochimique où les échantillons ont été testés à une concentration de 15 g.L^{-1} , les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'activité. * Les moyennes $\pm$ écart type ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tukey (p value < 0,05).

Compte tenu des résultats précédents, l'évaluation de l'inhibition de l'activité de la DPP-IV des cellules Caco-2 en culture n'a été réalisée qu'à partir des échantillons Brut I2, testés à une concentration de 5 g.L^{-1} de matière sèche. Les résultats montrent que le produit FCtl présente la plus forte capacité d'inhibition de l'enzyme avec un pourcentage d'inhibition proche de 72 % (**Figure 76**). Les fermentâts bactériens sont quant à eux moins efficaces pour inhiber la DPP-IV à la même concentration, les pourcentages d'inhibition étant compris entre 51 et 58 %.

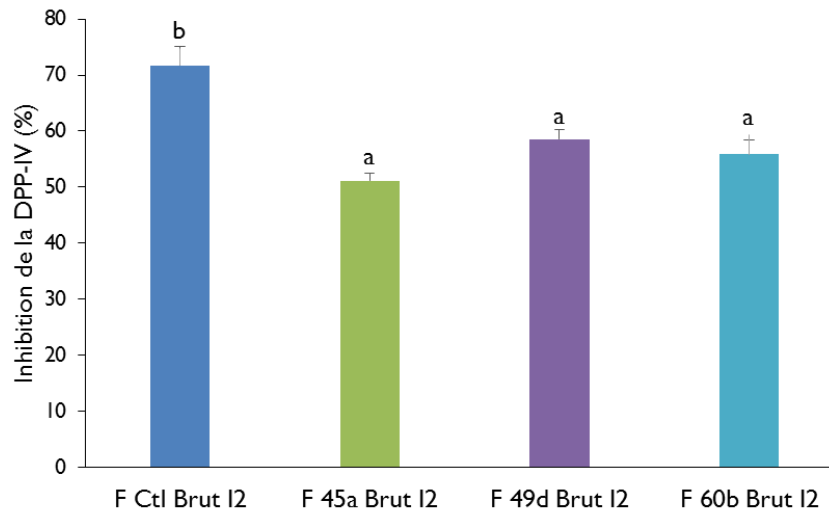


Figure 76 : Inhibition de la DPP-IV, exprimée par les cellules Caco-2, par les différents produits fermentés digérés.

L'inhibition de la DPP-IV a été déterminée *in situ* sur cellules Caco-2, les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'activité. * Les moyennes $\pm$ écart type ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tukey (p value < 0,05).

5.3. Impact sur la stimulation de la sécrétion du GLP-1

La capacité des produits fermentés à stimuler la sécrétion de l'hormone GLP-1 par les cellules entéroendocrines STC-1 a été évaluée. Après un contact de 2 h entre les cellules intestinales et les produits de fermentation digérés à des concentrations de 5 et 10 g.L⁻¹, le GLP-1 actif contenu dans le surnageant de culture est dosé par dosage radio-immunologique.

Le tampon d'incubation a été utilisé en tant que témoin afin d'obtenir un niveau basal de sécrétion du GLP-1 par les cellules STC-1. Seuls les fermentats FCtl Brut I2, F60b Brut I2 et FCtl UFP I2 stimulent significativement la sécrétion du GLP-1 pour une concentration de 10 g.L⁻¹ de matière sèche. Ainsi, les concentrations en GLP-1 mesurées dans les surnageants pour les fermentats FCtl et F60b Brut I2 sont respectivement de 1261 et 1707 pM. Néanmoins, la différence entre ces deux conditions n'est pas significative (**Figure 77**). Ces résultats montrent que les peptides et les acides aminés contenus dans les fermentats digérés sont capables de stimuler la sécrétion de GLP-1. En revanche ils ne stimulent pas plus la sécrétion de GLP-1 que le contrôle digéré.

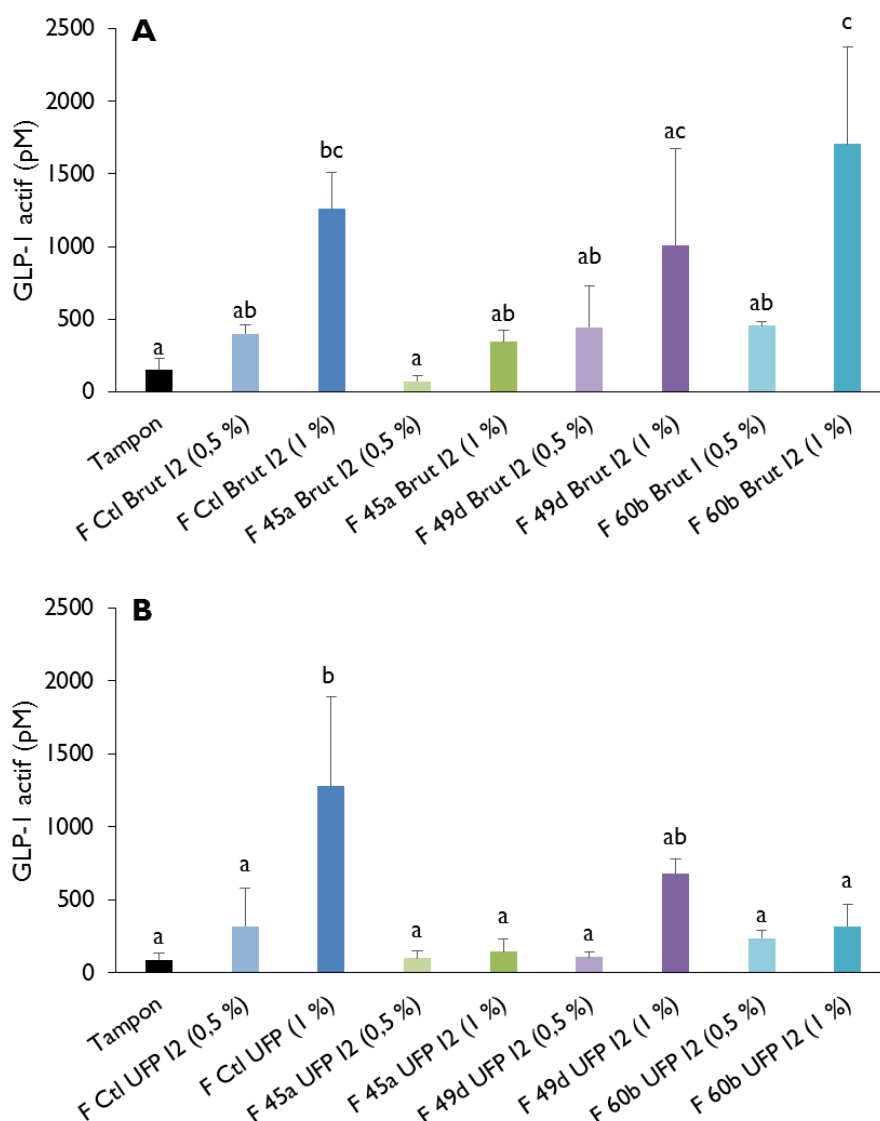


Figure 77 : Effets des différents produits fermentés ou perméats digérés sur la sécrétion du GLP-1 actif par les cellules STC-1.

Les échantillons ont été mis en contact à des concentrations de 0,5 ou 1 % (p/v) avec les cellules STC-1 pendant 2 h, le GLP-1 actif présent dans le surnageant a par la suite été dosé par dosage radio-immunologique. **A** : effets des produits bruts digérés, **B** : effets des perméats digérés. *Au sein du même graphe, les moyennes $\pm$ écart type ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tukey (p value < 0,05).

5.4. Inhibition de l'ACE

La capacité des produits de fermentation à inhiber l'activité de l'ACE a été évaluée par un test biochimique *in vitro*. Pour cette activité, tous les échantillons ont été testés, les fermentâts bruts avant et après digestion (F Brut et F Brut I2) ainsi que ces mêmes produits après une ultrafiltration réalisée avant digestion (F UFP et F UFP I2). La **Figure 78** représente les IC_{50} calculées pour ces différents produits, cette représentation permet de visualiser l'impact de l'ultrafiltration et/ou de la DGI sur l'inhibition de l'ACE par les fermentâts.

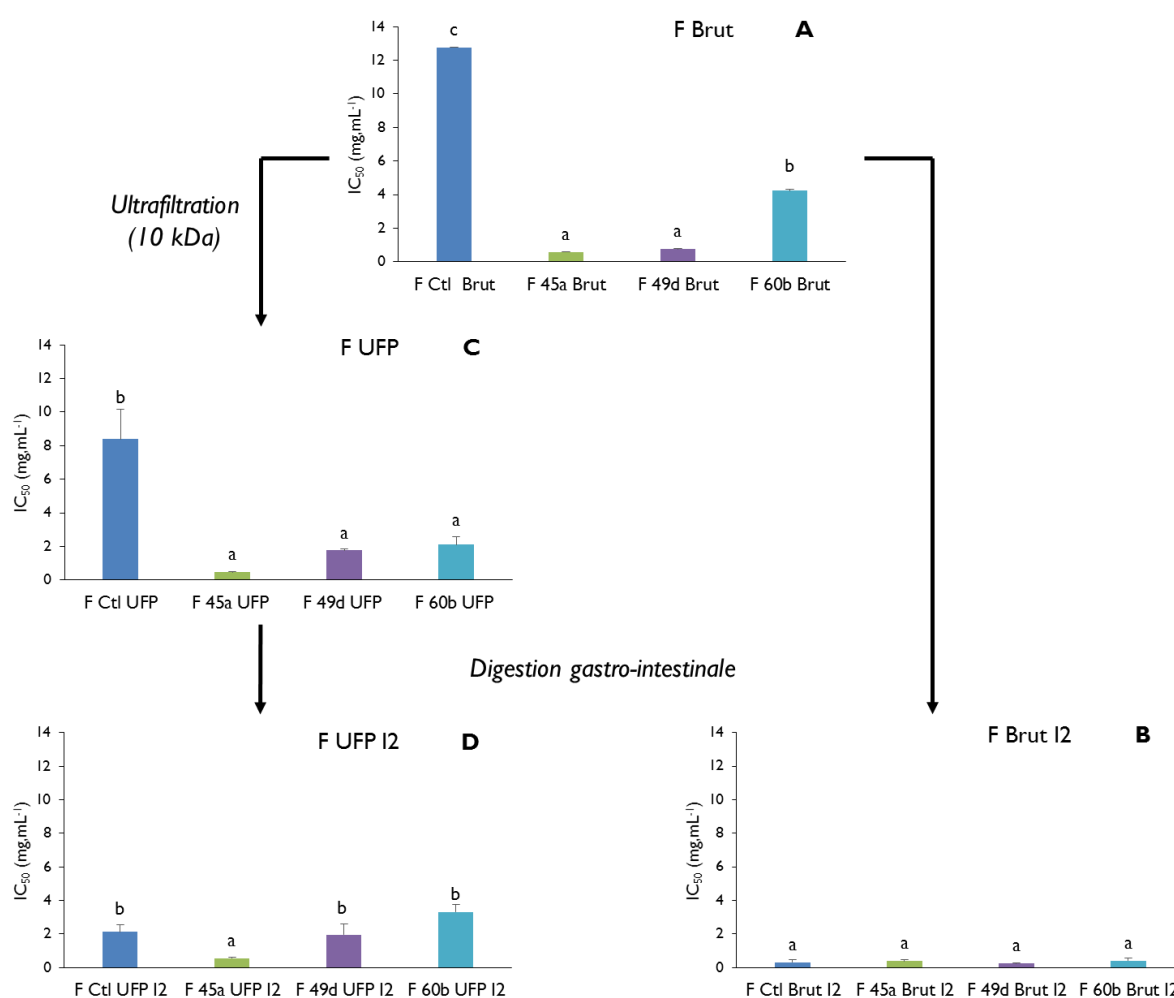


Figure 78 : Effets des produits fermentés et de leurs perméats sur l'inhibition de l'ACE.

L'inhibition de l'ACE a été déterminée par un test biochimique, les résultats sont exprimés en IC_{50} .

A : effet des produits fermentés bruts, **B** : effets des produits fermentés bruts après digestion gastro-intestinale, **C** : effets des perméats d'ultrafiltration, **D** : effets des perméats d'ultrafiltration après digestion gastro-intestinale.

*Au sein du même graphique, les moyennes $\pm$ écart type ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tukey (p value < 0,05).

Les fermentâts bactériens bruts présentent un fort pouvoir inhibiteur de l'activité de l'ACE (valeurs d'IC₅₀ faibles) en comparaison avec le contrôle lait (l'IC₅₀ du FCtl Brut est égale à 12,7 mg.mL⁻¹) (**Figure 78A**). Les produits fermentés les plus inhibiteurs de l'ACE étant le F45a et F49d Brut avec des IC₅₀ respectives de 0,56 et 0,75 mg.mL⁻¹. Après la digestion de ces produits bruts (F Brut I2), les valeurs d'IC₅₀ diminuent de façon conséquente, notamment pour le contrôle lait (FCtl Brut I2) (**Figure 78B**). En outre, les produits bruts après digestion deviennent tous équivalents vis-à-vis de l'inhibition de l'ACE, les IC₅₀ étant comprises entre 0,24 et 0,41 mg.mL⁻¹.

Les fermentâts ayant subi une ultrafiltration avant la DGI (F UFP), montrent la même tendance que les produits bruts (**Figure 78C**). Comme précédemment, le contrôle lait présente une IC₅₀ de 8,37 mg.mL⁻¹, ce qui est bien supérieur aux IC₅₀ des produits de fermentation comprises entre 0,47 et 2,11 mg.mL⁻¹. Après digestion des produits ultrafiltrés (F UFP I2) (**Figure 78D**), seul le fermentât contrôle (FCtl UFP I2) voit son IC₅₀ diminuée à 2,13 mg.mL⁻¹. Les produits F49d et F60b UFP I2 présentent des IC₅₀ similaires au contrôle (1,96 et 3,3 mg.mL⁻¹ respectivement) alors que le F45a UFP I2 possède une IC₅₀ égale 0,55 mg.mL⁻¹ soit 4 fois inférieure au contrôle.

Ces travaux montrent l'impact des produits issus de la fermentation bactérienne sur l'inhibition de l'ACE en comparaison au contrôle lait. De plus, il a été constaté que, contrairement à l'ultrafiltration, la DGI modifie considérablement le potentiel d'inhibition des produits et tend à normaliser les fermentâts entre eux. Néanmoins, la réalisation d'une ultrafiltration avant la DGI permet d'obtenir un effet significatif du fermentât F45a UFP I2 par rapport au contrôle. Globalement, il a été observé que l'activité de ce fermentât issu de la souche *L. helveticus* 45a n'est pas vraiment modifiée suite à l'ultrafiltration ou encore à la DGI.

5.5. Impact sur l'absorption du calcium

La capacité des fermentâts à moduler l'absorption du calcium a été évaluée en utilisant les cellules Caco-2. Dans un premier temps, les produits ont été testés pour leur capacité à moduler l'incorporation du calcium par les cellules intestinales après un contact de 7 h en utilisant une sonde fluorescente permettant de suivre l'évolution du taux de calcium intracellulaire. Par la suite, les fermentâts ont été testés pour leur capacité à moduler le gène codant pour le transporteur du calcium *trpv6* après un contact de 7 h avec les cellules Caco-2.

Concernant l'incorporation du calcium, les produits ont été mis en contact avec les cellules Caco-2 à une concentration de 10 g.L^{-1} de matière sèche pendant 7 h, après lavage des cellules, la sonde fluorescente a été incorporée et la fluorescence a été suivie pendant 30 sec avec une injection de CaCl_2 à 9 sec de la cinétique. L'injection d'une quantité importante de calcium dans le puit entraîne une entrée brutale de calcium dans les cellules conduisant à une augmentation de la fluorescence mesurée, l'augmentation résultante sera dépendante du contact avec les produits de fermentation réalisés en amont. Les résultats sont exprimés en fonction du ratio de fluorescence mesurée après injection sur celle avant l'injection (**Figure 79**). Après contact avec un tampon PBS (utilisé comme témoin), l'émission de fluorescence après injection du calcium est 1,08 fois supérieure à celle avant l'injection. Une augmentation significative de l'incorporation du calcium par les cellules Caco-2 est observée pour tous les produits en comparaison avec le tampon PBS. Le FCtl Brut I2 entraîne une entrée de calcium 1,23 fois supérieure tandis que les fermentâts bactériens équivalents conduisent à un ratio d'entrée significative de calcium compris entre 1,3 et 1,33 (**Figure 79A**). La même tendance est observée pour les fermentâts F UFP I2 mais seuls les fermentâts F49d et F60b UFP I2 entraînent une amélioration significative de l'incorporation du calcium en comparaison avec le contrôle lait (FCtl UFP I2) (**Figure 79B**).

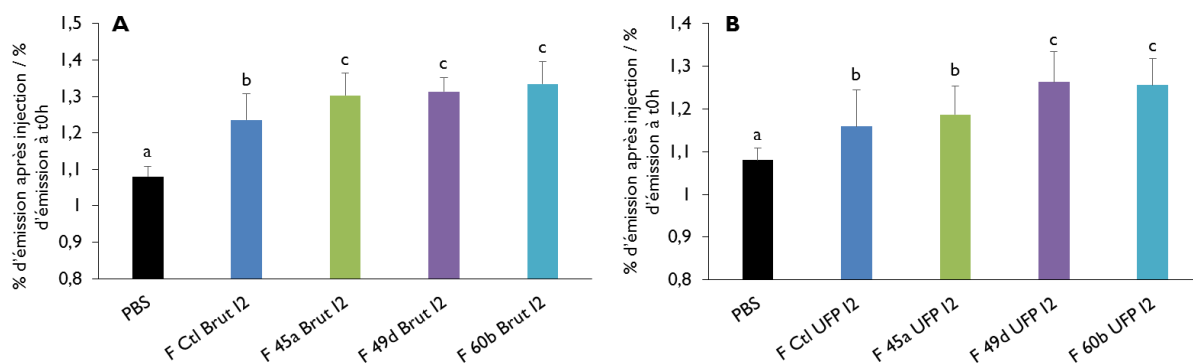


Figure 79 : Effets des produits fermentés et de leurs perméats sur l'incorporation du calcium par les cellules Caco-2.

Les échantillons ont été mis en contact avec les cellules Caco-2 à une concentration de 10 g.L^{-1} pendant 7 h. Par la suite, une sonde calcium a permis de suivre la quantité de calcium intracellulaire. L'incorporation du calcium a été déterminée en fonction de l'augmentation de fluorescence de la sonde après ajout d'une importante quantité de calcium dans le milieu de culture des cellules. Les résultats sont exprimés par le ratio entre la valeur de fluorescence, mesurée après injection, et la valeur de fluorescence basale avant injection. **A** : effets des produits bruts digérés, **B** : effets des perméats digérés.

*Au sein du même graphique, les moyennes $\pm$ écart type ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tukey (p value < 0,05).

La capacité des fermentâts à moduler l'absorption du calcium a également été réalisée en étudiant l'expression du gène *trpv6* codant pour le transporteur du calcium par les cellules Caco-2. Les produits bruts et perméâts digérés ont été mis en contact avec les cellules Caco-2 durant 7 h et les variations dans l'expression du gène *trpv6* ont ensuite été étudiées par qPCR. Les résultats montrent que les fermentâts bactériens F45a, F49d et F60b Brut I2 sont capables de moduler positivement et de manière significative l'expression du transporteur de calcium en comparaison avec le contrôle lait et le tampon PBS. L'expression du gène est en effet 10 à 21 fois supérieures après contact avec les fermentâts que pour le contrôle (**Figure 80A**) avec une expression plus importante induite par le F49d Brut I2. L'effet des fermentâts ultrafiltrés (F UFP I2) est moins prononcé et surtout non significatif par rapport au lait non fermenté (FCtl UFP I2), même si une tendance à l'induction du gène est observée (**Figure 80B**).

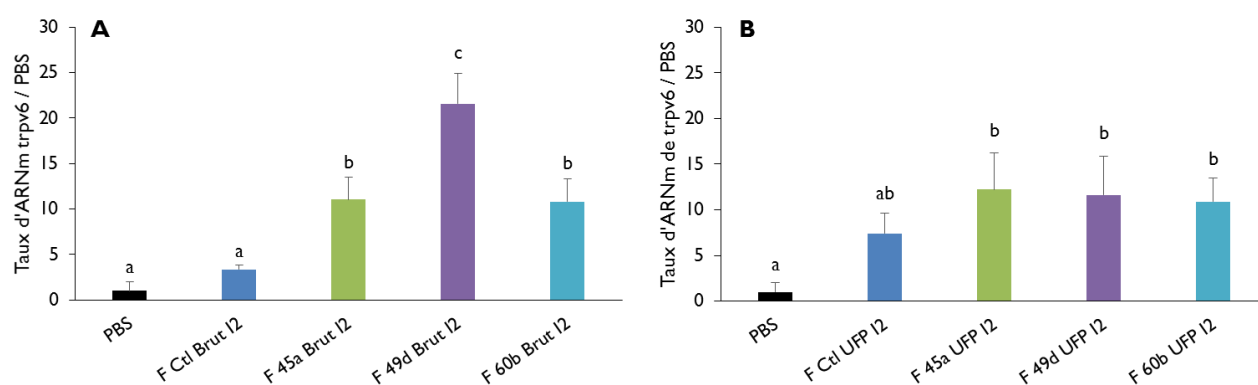


Figure 80 : Effets des produits fermentés et de leurs perméâts digérés sur l'expression du gène *trpv6* codant pour le transporteur du calcium.

Les échantillons ont été mis en contact avec les cellules Caco-2 à une concentration de 10 g.L⁻¹ pendant 7 h. L'expression du gène a été déterminée par qPCR et les résultats sont exprimés en fonction du taux mesuré dans la condition contrôle (tampon PBS). **A** : effet des produits fermentés bruts après digestion, **B** : effets des perméâts après digestion.

*Au sein du même graphe, les moyennes $\pm$ écart type ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tukey (p value < 0,05).

Ces travaux montrent la capacité des fermentâts bactériens notamment les fermentâts bruts, à impacter l'absorption du calcium par les cellules Caco-2, ceci vraisemblablement en lien avec la capacité des fermentâts à moduler l'expression du gène *trpv6*. Après ultrafiltration des fermentâts, la capacité de modulation de *trpv6* est perdue ou en tout cas non significative par rapport au contrôle lait. Seuls les fermentâts F49d et F60b UFP I2, conservent leur capacité d'amélioration de l'incorporation du calcium par les cellules intestinales.

6. Mise au point d'un procédé de production en continu d'un hydrolysât d'intérêt

L'objectif final de ce chapitre concerne le développement d'un procédé de production en continu d'un produit de fermentation du lait par la souche *L. helveticus* 45a ayant une activité d'inhibition de l'ACE. Dans cette étude, la fermentation continue a été réalisée soit dans un bioréacteur classique (BRC), similaire à celui utilisé lors des batch-fermentations, ou alors dans un bioréacteur à membrane (BRM) où les bactéries seront retenues dans le bioréacteur permettant ainsi un recyclage total des cellules bactériennes. L'objectif étant de comparer la productivité de ces deux bioréacteurs. Afin de compléter le procédé, le produit de fermentation obtenu sera par la suite atomisé pour obtenir un produit stable et l'activité d'inhibition de l'ACE sera étudiée.

6.1. Fermentations en mode continu

Les fermentations continues sont réalisées dans deux types de bioréacteurs. Chacun étant équipé d'une pompe permettant de soutirer le milieu du réacteur et d'une seconde pompe servant à alimenter le réacteur en milieu de culture pour maintenir un volume constant. La particularité de la fermentation en BRM réside dans le couplage du bioréacteur à une membrane de microfiltration (0,2 μm) (**Figure 81**). Cette membrane a été préférée à la membrane d'ultrafiltration utilisée précédemment pour éviter le colmatage trop rapide de la membrane lors du passage du fermentât contenant les cellules bactériennes.



Figure 81 : Présentation du bioréacteur à membrane et du montage pour le fonctionnement du procédé en continu.

La souche *L. helveticus* 45a est cultivée dans les mêmes conditions que celles utilisées lors des cultures en mode batch, les cellules sont inoculées à une DO_{600nm} égale à 0,3. Durant les premières 24 h de culture, la fermentation est conduite en mode batch afin d'obtenir une concentration bactérienne suffisante pour le début de la phase continue. Après 24 h de batch, la souche atteint une DO_{600nm} moyenne égale à 4,5 entre les deux bioréacteurs (**Figure 82**).

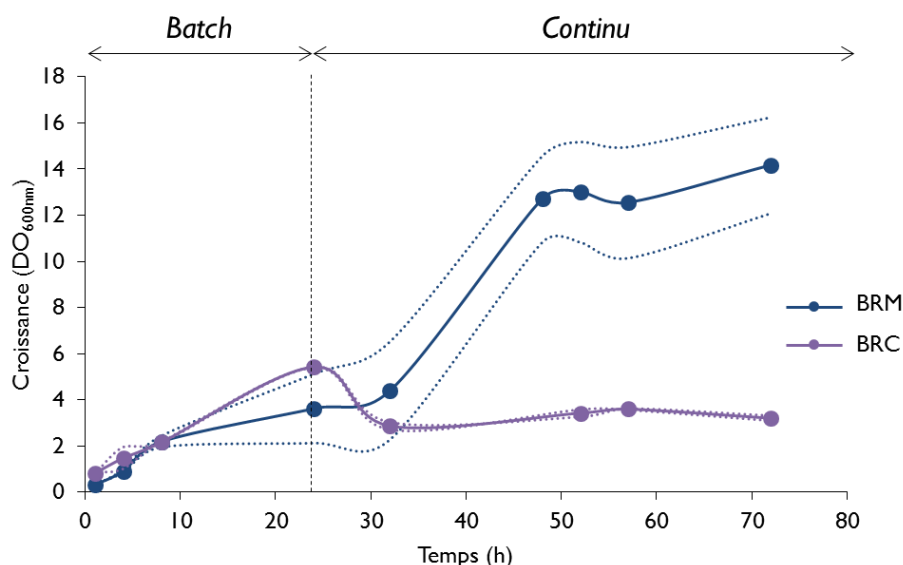


Figure 82 : Croissance de la souche *L. helveticus* 45a au cours de la fermentation en mode continu dans un bioréacteur classique ou un bioréacteur à membrane.

Courbes de croissance obtenues dans un bioréacteur classique (BRC, en violet) et dans un bioréacteur à membrane (BRM, en bleu). La croissance bactérienne a été déterminée par mesure de la DO à 600 nm. La souche est inoculée à une DO égale à 0,3 puis cultivée pendant 24 h en mode batch avant le début de la phase continue. La croissance est représentée par la moyenne de deux fermentations indépendantes (courbes pointillées).

Cette concentration va ensuite évoluer avec le début de la phase continue et surtout différemment en fonction du réacteur utilisé. Dans un BRC, la concentration chute après 8 h de phase continue à une DO_{600nm} égale à 2,7. Une stabilité de la croissance est ensuite observée jusqu'à la fin de la fermentation avec une DO_{600nm} finale de 3. A l'inverse dans un BRM, la concentration bactérienne augmente nettement, pour atteindre une DO_{600nm} égale à 12,7 après 48 h de culture. Ce qui montre la rétention des cellules bactériennes par la membrane de microfiltration. Par la suite, la concentration bactérienne restera relativement stable jusqu'à la fin de la fermentation avec une DO_{600nm} finale de 14,4. La stabilité de la croissance au cours des dernières 24 h dans un procédé avec recyclage total des cellules (BRM) révèle une limitation. Cette limitation provient soit d'un manque de substrat, soit de la présence d'un inhibiteur de croissance.

Les dosages du lactose et de l'acide lactique ont permis de suivre l'évolution de la disponibilité du substrat carboné pour les cellules bactériennes au cours de la fermentation. La concentration de lactose initialement présente dans le milieu de culture est d'environ 52 g.L⁻¹ (**Figure 83**), cette quantité diminue fortement au cours de la phase de batch pour atteindre 0,1 g.L⁻¹.

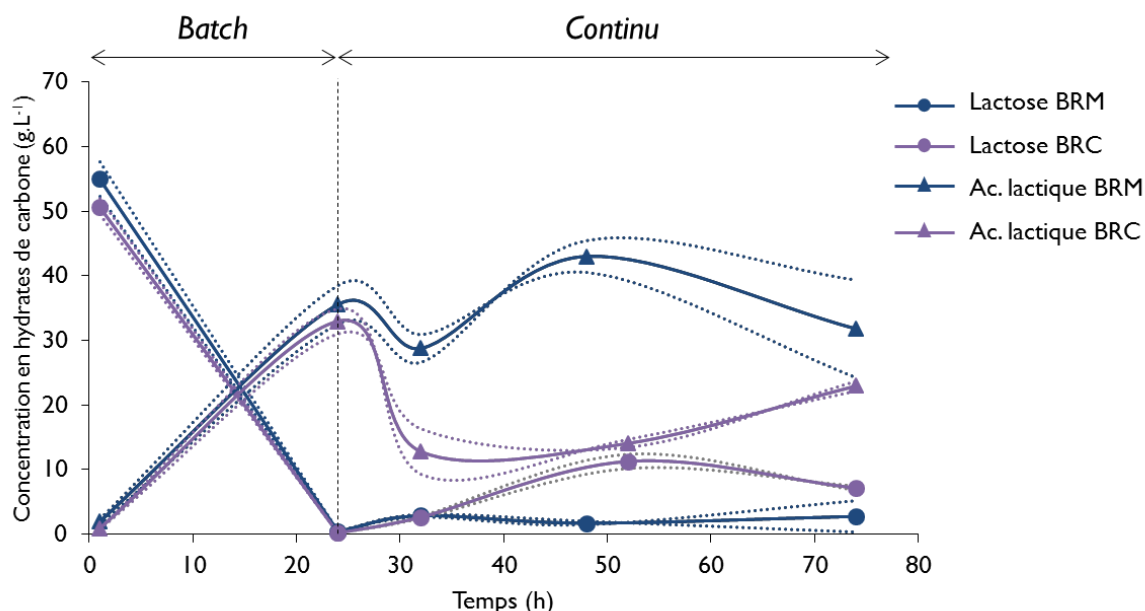


Figure 83 : Evolution des concentrations en lactose et en acide lactique au cours de la fermentation du lait par la souche *L. helveticus* 45a en mode continu dans un bioréacteur classique ou dans un bioréacteur à membrane.

Courbes des concentrations en lactose et en acide lactique obtenues dans un bioréacteur classique (BRC, en violet) et dans un bioréacteur à membrane (BRM, en bleu). Les concentrations d'acide lactique (triangles) et de lactose (ronds) ont été déterminées par HPLC en utilisant une colonne Fast Fruit Juice. Les résultats sont exprimés par la moyenne de deux fermentations indépendantes (courbes pointillées).

En conséquence de la consommation de lactose, la quantité d'acide lactique dans le bioréacteur augmente durant les premières 24 h de culture (passant de 0,8 à 34 g.L⁻¹ d'acide lactique). Au début de la phase continue en BRC, la concentration en lactose dans le bioréacteur augmente légèrement et atteint environ 11 g.L⁻¹ à 52 h de culture et reste stable jusqu'à la fin de la culture. Concernant l'acide lactique, sa concentration va diminuer fortement au début de la phase continue et atteindre 12 g.L⁻¹ après 32 h. Par la suite, la concentration va légèrement augmenter aboutissant à 22 g.L⁻¹ d'acide lactique à 72 h de culture. Dans le BRM, la concentration en lactose reste quasiment nulle tout au long de la phase continue (1,6 g.L⁻¹ à 48 h de culture). Cela signifie que, durant cette phase, la quantité de lactose apportée est instantanément consommée par la population bactérienne. Par la suite, l'évolution de la quantité d'acide lactique va suivre la croissance bactérienne avec une forte augmentation au cours des premières 24 h de phase continue (43 g.L⁻¹ d'acide lactique après 48 h de culture) puis une stabilisation jusqu'à la fin de la fermentation. L'acide lactique est également séparé du milieu de fermentation, en effet, une

quantité importante d'acide lactique est retrouvée dans la cuve produit (données non présentées). Ces travaux montrent l'évolution de la nutrition carbonée de la souche bactérienne au cours de la fermentation. Lors d'une culture en BRM, l'absence du substrat (lactose) dans le bioréacteur après 48 h de culture a été constatée, ce qui constitue probablement un facteur limitant de la croissance bactérienne.

Concernant la production de peptides au cours de la fermentation, la concentration peptidique initiale dans le bioréacteur est de 3 g.L^{-1} , cette quantité va presque quintupler durant les premières 24 h de batch (**Figure 84**).

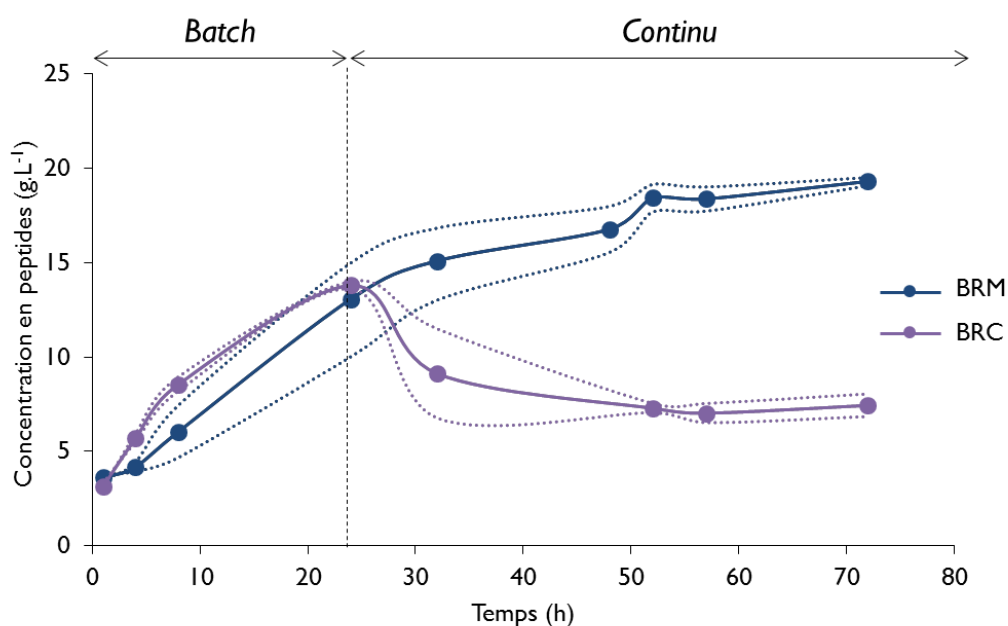


Figure 84 : Production de peptides par la souche *L. helveticus* 45a au cours de la fermentation en mode continu dans un bioréacteur classique ou un bioréacteur à membrane. Courbes de concentrations peptidiques obtenues dans un bioréacteur classique (BRC, en violet) et dans un bioréacteur à membrane (BRM, en bleu). Les concentrations peptidiques ont été déterminées dans le bioréacteur par dosage au réactif de Folin-Ciocalteu. Les concentrations sont représentées par la moyenne de deux fermentations indépendantes (courbes pointillées).

Au cours de la phase continue en BRC, la concentration peptidique chute de moitié après 52 h de culture pour atteindre environ 7 g.L^{-1} puis reste constante jusqu'à la fin de la fermentation. En BRM, la concentration peptidique va augmenter plus doucement que lors de la phase batch, et finira par atteindre 19 g.L^{-1} de peptides dans le réacteur après 72 h. Les concentrations peptidiques retrouvées dans les cuves produits évoluent également en fonction du réacteur considéré. En BRC, la concentration dans la cuve produit est un reflet de la concentration retrouvée dans le bioréacteur puisque le fermentât est simplement soutiré du réacteur. A l'état d'équilibre (72 h de culture), la concentration peptidique dans la cuve produit d'un BRC

s'accumule à une vitesse de $0,027 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Dans un BRM, elle s'accumule à une vitesse de $0,045 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ aux mêmes temps de culture. Ces résultats montrent la séparation des peptides du milieu de culture au cours de la fermentation par utilisation de la membrane de microfiltration. Une part importante de peptides reste néanmoins présente dans le bioréacteur. En effet, à la fin du procédé de fermentation, une quantité de 57,9 g de peptides est retrouvée dans le BRM tandis qu'une quantité de 155,2 g a été déterminée dans la cuve produit. Il y a donc bien un phénomène de rétention des peptides par la membrane de microfiltration au cours du procédé.

Les différents échantillons et surnageants issus de la fermentation en BRM ont été analysés par SEC. Cela permet d'observer l'évolution des protéines et des peptides à la fois dans le bioréacteur et dans la cuve produit (**Figure 85**) et de vérifier l'efficacité de la séparation des peptides du milieu de fermentation par la membrane de microfiltration.

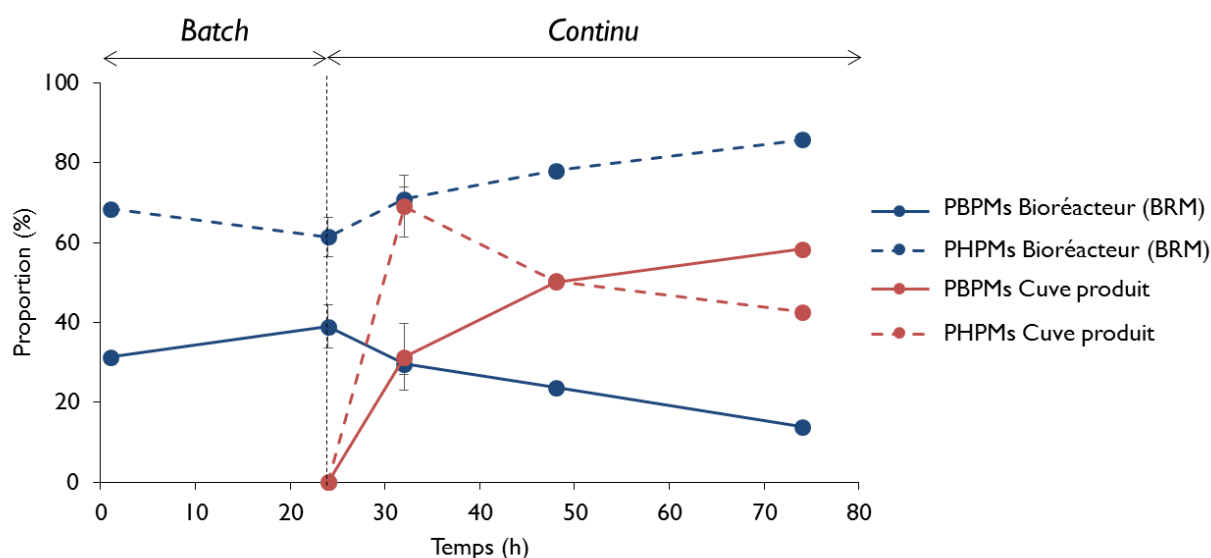


Figure 85 : Intégrations des chromatogrammes obtenus par analyse SEC des surnageants de culture issus de la fermentation en bioréacteur à membrane.

Les intégrations ont été réalisées selon deux régions distinctes des chromatogrammes : les PHPMs (courbes pointillées) et les PBPMs (courbes pleines). En bleu, les surnageants issus du bioréacteur et en rouge, les prélèvements issus de la cuve produit. Les résultats sont représentés par la moyenne $\pm$ écart type de deux fermentations indépendantes.

Durant la phase de batch, la proportion de PBPM augmente pour une diminution de la part de PHPM témoignant d'une activité protéolytique. Pendant la phase continue, la proportion de PBPM diminue progressivement dans le bioréacteur et augmente dans la cuve produit ce qui montre bien la séparation des peptides du milieu de fermentation par la membrane de microfiltration. De plus, la part de PHPM dans le bioréacteur augmente durant le mode continu, ce qui confirme la rétention de certaines protéines par la membrane qui sont ainsi concentrées

dans le réacteur. Au début de la phase continue, une proportion importante de PHPM est également observée dans la cuve produit, probablement constituée de fragments protéiques non retenus par la membrane.

Les différents procédés de fermentation réalisés au cours de ce projet à savoir, le mode batch, le mode continu ouvert dans un bioréacteur classique (BRC) et le mode continu avec recyclage total des cellules dans un bioréacteur à membrane (BRM), ont été comparés en termes de productivité en peptides (**Tableau 24**).

Tableau 24 : Comparaison des résultats obtenus à partir des 3 procédés de fermentation réalisés au cours du projet : le mode batch, le continu en bioréacteur classique (BRC) et le continu en bioréacteur à membrane (BRM).

¹ productivité calculée selon le rapport de la concentration peptidique et du temps total du procédé.

² productivité instantanée calculée à l'état d'équilibre (72 h).

³ productivité spécifique calculée selon le rapport de la quantité totale de peptides et de la biomasse bactérienne. La biomasse a été calculée en fonction de la DO_{600nm} à partir de l'équation décrite par Wegkamp *et al.*, (2010).

	Batch à 24 h	Continu (BRC) à 72 h	Continu (BRM) à 72 h
Concentration moyenne en peptides produits ($g.L^{-1}$)	15,9 ($\pm 0,1$)	7,43 ($\pm 0,8$)	19,3 ($\pm 0,3$)
Productivité moyenne du bioréacteur ¹ ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	0,66 ($\pm 0,01$)	0,1 ($\pm 0,02$)	0,27 ($\pm 0,01$)
Productivité instantanée du bioréacteur à l'état d'équilibre ² ($g.L^{-1}.h^{-1}$)		0,74 ($\pm 0,11$)	1,93 ($\pm 0,04$)
Productivité spécifique moyenne ³ ($g.g^{-1}$)	9,99 ($\pm 0,28$)	7,13 ($\pm 0,65$)	15,8 ($\pm 0,45$)

La productivité instantanée du bioréacteur (à 72 h de culture) est plus importante lors d'un procédé avec recyclage total des cellules (BRM). De la même manière, la productivité moyenne du BRM est de $0,27 g.L^{-1}.h^{-1}$ de peptides tandis que celle du BRC est de $0,1 g.L^{-1}.h^{-1}$ soulignant l'avantage du BRM pour la production de peptides. Le procédé de type batch est néanmoins plus productif que les deux procédés continus ($0,66 g.L^{-1}.h^{-1}$). La productivité a également été calculée en fonction de la quantité totale de peptides produits rapportée à la biomasse, ce qui permet d'obtenir une productivité spécifique moyenne. Encore une fois, le continu ouvert en BRC montre la plus faible productivité spécifique. Cette productivité spécifique augmente pour un bioréacteur fonctionnant en mode batch ($9,99 g.g^{-1}$) mais elle est encore plus importante dans un BRM, atteignant $15,8 g.g^{-1}$ de peptides produits par unité de biomasse. Ces données suggèrent que même si la productivité moyenne est plus faible l'utilisation d'un bioréacteur à membrane en continu à l'avantage d'améliorer la productivité spécifique. Cela est

probablement dû à l'enrichissement de la biomasse dans le bioréacteur par la membrane de microfiltration.

6.2. Atomisation du produit de fermentation

Le procédé de fermentation en continu dans un BRM a permis d'obtenir un produit de fermentation semi-purifié contenant entre autres les peptides d'intérêt et de l'acide lactique à des concentrations respectives de 10,51 g.L⁻¹ et 29,73 g.L⁻¹. Le pH du produit est de 5,95 et le pourcentage de matière sèche est de 7,86 % (**Tableau 25**).

Tableau 25 : Caractéristiques du produit issu de la fermentation par la souche *L. helveticus* 45a en mode continu avec recyclage totale des cellules (BRM).

Produit	
pH	5,95
MS (%)	7,86 (± 1)
Peptides (g.L ⁻¹)	10,51 (± 2,63)
Acide lactique (g.L ⁻¹)	29,73 (± 6,17)

Afin d'obtenir un produit stable, la mise au point de l'atomisation du produit de fermentation a été réalisée. Cette mise au point a été conduite en déterminant la concentration en maltodextrine (utilisée comme agent de charge), nécessaire pour obtenir le meilleur rendement d'atomisation.

Différentes concentrations en maltodextrine, allant de 0 à 20 % (m/v) ont été testées et le rendement en matière sèche du produit atomisé a par la suite été calculé pour chaque concentration. Pour une atomisation réalisée sans ajout de maltodextrine, le rendement du procédé constaté est de 0 % (**Figure 86**).

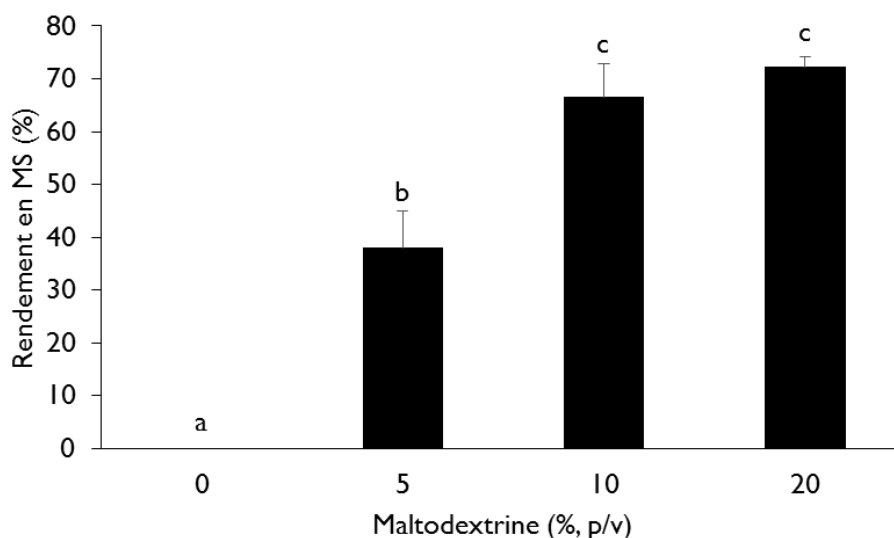


Figure 86 : Impact de la concentration en maltodextrine sur le rendement d'atomisation du produit de fermentation.

Les rendements en matière sèche ont été calculés après atomisation du produit contenant 0, 5, 10 ou 20 % (p/v) de maltodextrine. *Les moyennes $\pm$ écart type ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tukey (p value < 0,05).

Ce rendement est erroné car en réalité impossible à calculer du fait que le produit après séchage a tendance à devenir collant et adhère aux parois de l'atomiseur rendant sa récupération impossible. Dès l'ajout de maltodextrine à 5 %, le rendement d'atomisation est augmenté à presque 40 %, il va ensuite atteindre un plateau à partir d'une concentration en maltodextrine de 10 %. La différence statistique entre des concentrations de 10 et 20 % de maltodextrine n'étant pas significative, une concentration de 10 % de cet agent de charge a été choisie pour l'atomisation du produit de fermentation, dans ces conditions le rendement d'atomisation moyen est de 66 %.

6.3. Impact du produit final sur l'inhibition de l'ACE

Pour terminer le développement du procédé de fermentation, l'activité biologique du produit de fermentation a été vérifiée. Au vu des résultats précédemment obtenus avec les produits de fermentation de la souche *L. helveticus* 45a, l'inhibition de l'ACE a été choisie comme activité biologique d'intérêt.

Les produits ont été testés avant et après atomisation ceci afin de vérifier l'impact du procédé sur l'inhibition de l'ACE. L' IC_{50} du produit de fermentation non atomisé (P45a) est égale à $1,87 \text{ mg.mL}^{-1}$ tandis que celle du produit atomisé (P45a A) est de 3 mg.mL^{-1} (**Figure 87**).

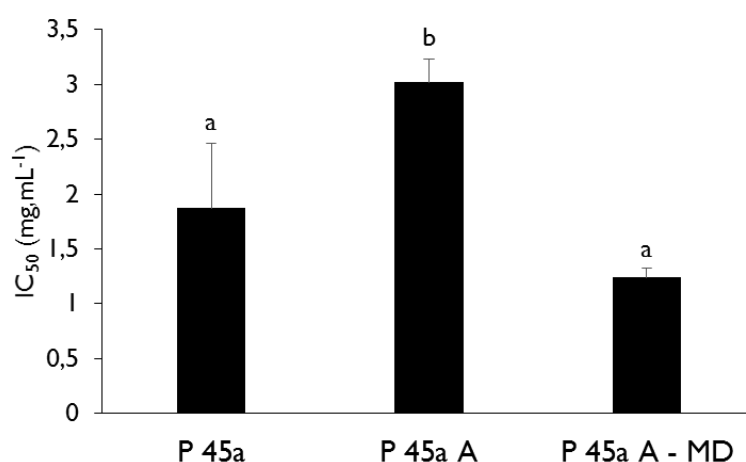


Figure 87 : Effets des produits de fermentation avant et après atomisation sur l'inhibition de l'ACE.

L'inhibition de l'ACE a été déterminée par un test biochimique, les résultats sont exprimés en IC_{50} . Le produit a été testé avant (P 45a) et après (P 45a A) atomisation. L'échantillon P45a – MD correspond à l' IC_{50} de l'échantillon P45a A moins la quantité théorique de maltodextrine (10 % p/v). *Les moyennes $\pm$ écart type ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tukey (p value < 0,05).

La valeur d' IC_{50} est calculée en fonction de la matière sèche totale, maltodextrine comprise dans le cas du produit atomisé. Il a cependant été constaté qu'une solution de maltodextrine à 10 % (m/v) présente un pourcentage d'inhibition de 0 % ce qui signifie que l'agent de charge ajouté n'impacte pas l'inhibition de l'ACE. Ainsi il est possible, à partir de l' IC_{50} déterminée pour le produit atomisé, de calculer l' IC_{50} théorique du produit sans tenir compte de la maltodextrine (P45a A - MD), l' IC_{50} résultante équivaut à $1,23 \text{ mg.mL}^{-1}$, et ne présente pas de différence significative avec le produit non atomisé. Ces résultats montrent que le procédé d'atomisation et l'ajout de maltodextrine n'entraînent aucune perturbation dans l'activité du produit de fermentation.

Pour aller plus loin, l'IC₅₀ du produit de fermentation a été comparée à celle obtenue avec le produit issu de la fermentation de type batch suivie d'une ultrafiltration du fermentat (F45a UFP) (**Figure 88**).

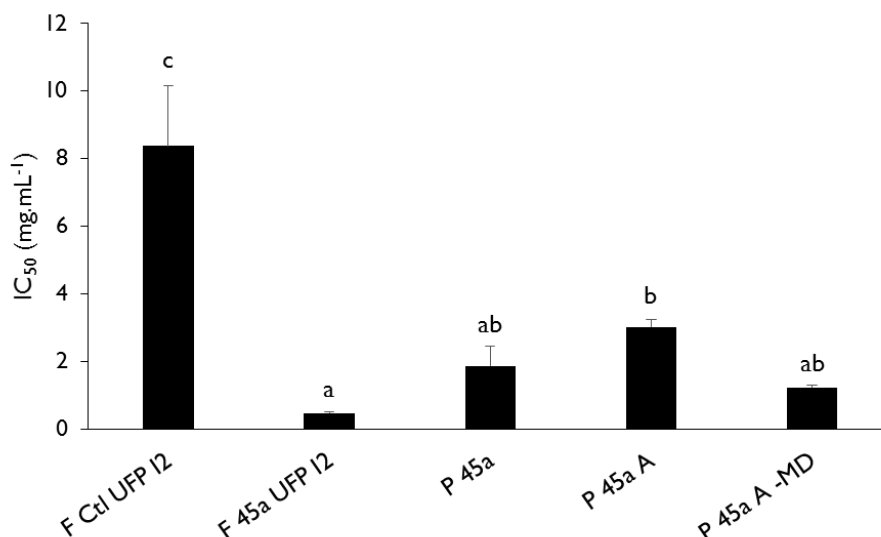


Figure 88 : Comparaison des IC₅₀ obtenus avec les produits issus des fermentations en mode batch et en mode continu dans un bioréacteur à membrane.

L'inhibition de l'ACE a été déterminée par un test biochimique et les résultats sont exprimés en IC₅₀. Les produits FCtl et F45a UFP I2 sont issus des fermentations en mode batch. Le produit issu de la fermentation en mode continu a été testé avant (P 45a) et après (P 45a A) atomisation. L'échantillon P45a – MD correspond à l'IC₅₀ de l'échantillon P45a A moins la quantité théorique de maltodextrine (10 %, p/v). *Les moyennes ± écart type ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tukey (p value < 0,05).

Pour rappel, l'IC₅₀ de ce produit était de 0,56 mg.mL⁻¹ et celle du contrôle lait équivalente à 8,37 mg.mL⁻¹. La comparaison de ces résultats montre que l'activité des produits de fermentation atomisé ou non, est très proche de l'activité obtenue précédemment avec le fermentât bactérien ultrafiltré. Ces résultats prouvent la répétabilité de l'activité biologique d'un fermentât produit par la souche *L. helveticus* 45a et de plus, démontrent la faisabilité du procédé de production en continu puisqu'un ingrédient actif contre l'ACE a été produit et semi-purifié en une seule et même étape.

I.V. Discussion

Les objectifs de ce chapitre sont de sélectionner des souches protéolytiques au sein de la collection de Mongolie et de les utiliser pour produire des hydrolysats peptidiques présentant des activités biologiques en lien avec la prévention de l'ostéoporose. Pour cela, deux criblages successifs ont été réalisés pour sélectionner les souches qui ont été utilisées pour la fermentation du lait et la production d'hydrolysats peptidiques. Ces hydrolysats ont ensuite été étudiés en détails pour différentes activités biologiques.

Dans le cadre d'une première stratégie de criblage, l'activité protéolytique des souches de la collection a été évaluée sur des géloses au lait. En partant du postulat que des souches présentant d'importantes capacités protéolytiques seront plus à même de libérer par fermentation une quantité de peptides élevées. Parmi l'ensemble des espèces étudiées, les souches de *L. helveticus* ont montré les meilleures activités protéolytiques. Cette espèce est en effet considérée comme la plus protéolytique au sein du genre *Lactobacillus* (Griffiths & Tellez, 2013). Les souches de *L. delbrueckii* possèdent également une activité protéolytique intéressante. Ces souches sont couramment utilisées comme starters de fermentation afin d'initier la protéolyse lors de la production de yaourt (Pailin *et al.*, 2001). Les dernières souches fortement représentées dans la collection, les *L. kefiranofaciens*, présentent seulement des activités protéolytiques modérées. Suite à ce premier criblage 15 souches ont été sélectionnées dont 9 souches de *L. helveticus* et 6 souches de *L. delbrueckii*. Ces souches ont été étudiées dans le cadre d'une seconde stratégie de criblage consistant en une analyse multiparamétrique de la protéolyse en lait écrémé.

Les capacités de fermentation des souches ont été évaluées en mesurant différents paramètres comme la croissance, l'acidification ou la production de peptides après 48 h de culture dans un lait écrémé UHT. Après fermentation, les souches de *L. helveticus* atteignent une densité cellulaire plus élevée que les souches de *L. delbrueckii*. Ceci entraîne une capacité d'acidification plus importante chez ces souches ce qui a déjà été observé et rapporté préalablement (Gandhi & Shah, 2014). Une ACP a alors été réalisée pour déterminer les corrélations existantes entre les différents paramètres mesurés. Cette analyse permet de synthétiser les informations fournies par un grand nombre de variables quantitatives (Lacou *et al.*, 2015). A titre d'exemple, Bezerra *et al.*, (2016) ont utilisé l'ACP pour étudier la protéolyse au cours de la production d'un fromage de chèvre (Coalho). Dans ce projet, le graphe des variables montrent qu'une croissance bactérienne importante et une capacité d'acidification

élevée, sont liées à une abondante production de peptides. Une telle corrélation a un sens physiologique. En effet, le système protéolytique de souches de *L. helveticus* étant très actif, il contribue d'une certaine manière à la croissance bactérienne, permettant aux bactéries de croître rapidement dans le lait. Du fait des nombreuses auxotrophies des Lactobacilles pour les acides aminés, cette capacité à dégrader efficacement les protéines laitières est un atout majeur (Courtin *et al.*, 2002; Griffiths & Tellez, 2013; Savijoki *et al.*, 2006).

Dans le cadre de l'analyse multiparamétrique des 15 souches sélectionnées, la distribution des gènes codant les protéases pariétales a été étudiée. Les résultats ont montré que toutes les souches de *L. delrueckii* possèdent le gène *prtB*, qui est à ce jour l'unique CEP décrite pour cette espèce (Hou *et al.*, 2015). Une plus grande hétérogénéité a été observée pour les souches de *L. helveticus* divisée en deux groupes : 6 souches présentant le gène *prth1* et 3 souches la combinaison des gènes *prth2* et *prth3*. De plus, il semble que la distribution des CEPs soit liée à la provenance de la souche puisque les 6 souches possédant le gène *prth1* ont été isolées d'airag (fabriqué à partir de lait de jument) tandis que les autres souches proviennent de sources différentes (laits de yak ou chamelle). L'unique présence du gène *prth1* au sein de souches de *L. helveticus* isolées d'airag a déjà été reportée (Miyamoto *et al.*, 2015). Par contre, la combinaison des gènes *prth2* et *prth3* est inhabituelle. En étudiant la distribution des CEPs parmi 51 souches de *L. helveticus* isolées en Europe ou en Amérique du nord, Broadbent *et al.*, (2011) ont reportés seulement 3 souches ayant ce même profil *prth2/prth3*. Cela semble confirmer de précédentes observations suggérant que les souches de *L. helveticus* isolées en Mongolie, diffèrent de souches d'origines plus occidentales en termes de profils de CEPs (Miyamoto *et al.*, 2015). L'espèce *L. helveticus* est caractérisée par cette diversité intra-spécifique élevée vis-à-vis des protéases pariétales. Ainsi par fermentation, différentes souches de *L. helveticus* peuvent conduire à la production de profils peptidiques variés (Sadat-Mekmene *et al.*, 2011b).

L'identification des peptides produits au cours de la fermentation a permis la construction de cartes de chaleur des peptides de la caséine β pour toutes les souches testées. La caséine β est le substrat préférentiel des protéases de *Lactobacillus* (Jensen *et al.*, 2009) et il est également connu que les CEPs présentent des spécificités de clivage différentes (Oberg *et al.*, 2002). Cependant, il est souvent difficile de comparer les résultats issus de différentes publications relatives à ce sujet. En effet selon les études, les caséines sont étudiées soit en tant que fragments, soit sous une forme purifiée ou encore en tant que micelles dans le lait ce qui influence forcément l'activité des protéases pariétales, notamment l'accès aux sites de clivages

sur le substrat (Sadat-Mekmene *et al.*, 2011a). Les travaux d'Oberg *et al.*, (2002) ont montré que plusieurs souches de *L. delbrueckii* présentent des spécificités d'hydrolyse différentes vis-à-vis d'un fragment de la caséine α_{s1} . A l'inverse, les résultats obtenus au cours de cette étude concernant les profils d'hydrolyse des souches de *L. delbrueckii* ont montré des régions de clivages communes. Ces souches sont probablement génétiquement proches mais les observations constatées sont peut-être dues au fait que l'hydrolyse de la caséine β a été étudiée sous une forme native (micelle) et non avec un fragment. Par une ACP réalisée à partir des cartes de chaleur, les souches de *L. delbrueckii* ont été clairement séparées des souches de *L. helveticus*, suggérant des différences au niveau des profils d'hydrolyse de la caséine β . Un résultat similaire a déjà été observé entre les souches *L. delbrueckii* CRL581 et *L. helveticus* CP790 incubées avec de la caséine β purifiée (Sadat-Mekmene *et al.*, 2011a). Il faut cependant remarquer que 3 souches de *L. helveticus* (*L. helveticus* 25c, 49d et 58b toutes possédant *prth1*) sont proches des souches de *L. delbrueckii* selon l'ACP. Les 3 autres souches de *L. helveticus* possédant le gène *prth1* sont plus proches des souches présentant le couple *prth2/prth3*. Alors que les génotypes *prtB* et *prth2/prth3* sont associés à des profils d'hydrolyse complètement opposés. Le cas des souches présentant *prth1* est plus complexe, car deux sous-groupes sont observés au sein du même génotype. Cela peut être dû à l'existence de différents allèles du gène *prth1* qui ne peuvent être distingués par PCR (Genay *et al.*, 2009).

L'analyse des résultats fournis par l'ACP a également permis d'identifier des régions préférentielles d'hydrolyse de la caséine β en fonction des différentes souches. Comme il a été vu précédemment, la dimension 2 de l'ACP représente la région hydrophile de la caséine β tandis que la dimension 1 concerne différentes régions incluses dans la partie hydrophobe de la protéine. La condition lait non inoculé a été utilisée afin de définir un motif basal de protéolyse due à l'activité des protéases endogènes au lait telles que la plasmine et la cathepsine D (Dallas *et al.*, 2016; Sadat-Mekmene *et al.*, 2011a). Les résultats obtenus montrent que ces enzymes endogènes ont un accès facilité à la région hydrophile de la caséine β , la condition lait étant en effet positionnée à une coordonnée très élevée sur la dimension 2. Toutes les souches de *L. delbrueckii* sont regroupées ensemble, suggérant des capacités de protéolyse homogènes. Elles sont également placées sur la partie positive de la dimension 1 et proche de l'origine de la dimension 2. A l'inverse, les souches de *L. helveticus* sont éparpillées le long de la dimension 1 reflétant une hétérogénéité plus élevée en termes de protéolyse. Les souches présentant le couple *prth2/prth3* sont positionnées loin dans la partie négative de la dimension 1 suggérant une hydrolyse préférentielle des régions hydrophobes de la caséine β . La capacité des souches

à cliver les régions hydrophobes de la protéine, régions moins accessibles (car participant à la structure des submicelles et des micelles de caséines) lorsque la caséine est sous forme micellaire (Dumas *et al.*, 1972), est un avantage significatif et témoigne d'une protéolyse différente, et plus adaptée à la croissance bactérienne que celle réalisée par les enzymes endogènes au lait.

Pour conclure sur cette partie, une approche originale a été conduite afin de sélectionner des souches possédant des activités protéolytiques particulières, au sein de la collection de Mongolie. L'analyse multiparamétrique réalisée a permis de montrer les corrélations entre croissance cellulaire, acidification et production de peptides. Une distribution différente des CEPs, entre des souches isolées en Mongolie et des souches d'origines européennes ou nord-américaines, a également été observée. De plus, une ACP a montré que cette distribution est corrélée au profil d'hydrolyse de la caséine β , ainsi les différentes souches étudiées ont montré des capacités différentes vis-à-vis de l'hydrolyse de la protéine. Cette analyse multiparamétrique a permis de sélectionner un nombre restreint de souches pour la suite du projet, les souches *L. helveticus* 45a, 49d et 60b. Ces souches présentent ainsi une distribution de CEPs différente, un taux de croissance élevé dans le lait, une capacité d'acidification importante, et surtout une hétérogénéité en termes de peptides produits au cours de la fermentation. Ce dernier critère est crucial pour la production de différents hydrolysats peptidiques qui présenteront ainsi des activités variées.

Afin de produire ces hydrolysats, des fermentations de type batch ont été réalisées en bioréacteur en utilisant les 3 souches sélectionnées. Le lait écrémé a été supplémenté en extrait de levure dans le but d'accélérer la croissance bactérienne, ce type de lait étant pauvre en peptides et en acides aminés ainsi qu'en vitamines liposolubles telles que la vitamine A ou D. De plus, l'utilisation d'un bioréacteur présente notamment l'avantage de pouvoir contrôler le pH du milieu durant la fermentation et ainsi le maintenir constant. L'espèce *L. helveticus* possède dans le lait un métabolisme de type homofermentaire c'est-à-dire que la majorité du lactose est converti en acide lactique. Il s'agit par conséquent de souches ayant d'importantes capacités d'acidification (Hebert *et al.*, 2000). Pour la fermentation, le maintien du pH à une valeur de 6 a été choisi afin de prévenir la coagulation du milieu mais également pour être proche du pH optimum de l'activité des protéases pariétales des Lactobacilles (Fira *et al.*, 2001) et ainsi générer une plus grande quantité de peptides. Ce phénomène a d'ailleurs été observé par Matar *et al.*, (1996) en utilisant la souche *L. helveticus* L89, alors que la croissance bactérienne n'était pas impactée entre une fermentation avec et une sans maintien du pH, la

production de peptides est nettement améliorée lorsque le pH du milieu était maintenu pendant la fermentation. Dans cette étude, des quantités importantes de peptides ont été mesurées au cours de la fermentation par les 3 souches en comparaison avec les fermentations réalisées dans le cadre de l'analyse multiparamétrique. A titre d'exemple, la fermentation du lait écrémé UHT sans contrôle du pH par la souche *L. helveticus* 45a a conduit à une production de 6,16 g.L⁻¹ de peptides après 48 h, tandis qu'au même temps d'incubation, la concentration en peptides dans le bioréacteur inoculé par cette souche était de 18,37 g.L⁻¹. La comparaison reste néanmoins limitée à cause des différences dans la composition des milieux utilisés. L'utilisation des 3 souches bactériennes en bioréacteur a donc permis de produire différents laits fermentés contenant des quantités relativement importantes de peptides. Pour la suite du projet, les fermentats ont soit été conservés en l'état soit ils ont subi une étape d'ultrafiltration afin d'éliminer les protéines restantes et conserver les peptides produits au cours de la fermentation.

Avant d'étudier les activités biologiques des fermentats, il est nécessaire d'évaluer leur comportement durant la DGI puisque le contenu peptidique sera en effet modifié par l'action des enzymes digestives (pepsine et pancréatine) et les protéines restantes seront hydrolysées par ces mêmes enzymes générant de nouveaux peptides (Caron *et al.*, 2016; Daliri *et al.*, 2017; Lamothe *et al.*, 2017; Sanchón *et al.*, 2018). Ainsi, dans le but d'obtenir les peptides ayant un réel impact au niveau intestinal, une digestion simulée *in vitro* a été réalisée sur les fermentats bruts et ceux ayant subis une ultrafiltration. Ces derniers fermentats (F UFP) n'ont été que faiblement impactés par la DGI que ce soit au niveau de leur concentration en peptides ou au niveau de la répartition des poids moléculaires des peptides. Un léger enrichissement est néanmoins observé après digestion du produit contrôle (FCtl UFP I2) probablement dû à l'autolyse des enzymes digestives. Ces résultats suggèrent que les peptides produits par les souches bactériennes au cours de la fermentation résistent à la digestion gastro-intestinale. Cette hypothèse doit néanmoins être confirmée par une analyse en spectrométrie de masse. Par exemple, il a été reporté que les tripeptides, IPP et VPP, résistent à la DGI (Ohsawa *et al.*, 2008). A l'inverse, les fermentats bruts ont vu une modification profonde de leur contenu peptidique au cours de la digestion. Ceci est dû à la présence de protéines non hydrolysées pendant la fermentation qui se retrouvent digérées par les enzymes du tube digestif. En effet, les protéines détectées par SEC dans les produits bruts deviennent complètement absentes à la fin de la DGI. Ce phénomène cohérent a déjà été observé lors d'une digestion *in vivo* de protéines laitières (Sanchón *et al.*, 2018). En conséquence, une importante quantité de peptides est libérée suite à la digestion de ces produits fermentés. Ces résultats ont été confirmés par

spectrométrie de masse où un plus grand nombre de peptides a été identifié dans les phases intestinales que dans les produits bruts. Jin *et al.*, (2016) ont suivi l'évolution des profils peptidiques durant la digestion du yaourt, tandis que 250 séquences ont pu être identifiées dans le yaourt non digéré, 466 peptides ont été identifiés dans la phase intestinale. L'importante libération de peptides au cours de la DGI des produits fermentés entraînent une réduction de l'hétérogénéité peptidique des différents produits au niveau de leur contenu peptidique. Cette hypothèse a été confirmée par les deux ACP réalisées à partir des séquences peptidiques identifiées. Que ce soit à partir de cartes de chaleur de la caséine β ou à partir de cartes peptidiques, la digestion tend à réduire la variabilité entre les produits fermentés, l'impact de la fermentation sur les contenus peptidiques est en effet moins visible après comparaison au lait non fermenté (FCtl).

Les activités biologiques des hydrolysats peptidiques ont été étudiées après DGI des produits fermentés. L'objectif principal de cette partie était de montrer l'intérêt de la fermentation par les souches de *L. helveticus* pour apporter un effet bénéfique au niveau intestinal. C'est pourquoi, le contrôle lait est ici essentiel afin de démontrer l'avantage de la fermentation bactérienne. Les activités ciblées dans ce projet étaient l'inhibition de la DPP-IV, la stimulation de la sécrétion du GLP-1, l'impact sur l'absorption du calcium et enfin l'inhibition de l'ACE.

L'impact des produits fermentés sur l'inhibition de la DPP-IV s'est révélé être limité en comparaison à celui du produit contrôle. Ces résultats ont également été confirmés par analyses bio-informatiques des séquences peptidiques identifiées par spectrométrie de masse. La recherche dans la base donnée MBPDB a montré la présence de séquences actives similaires dans les 4 produits. De plus, il a été prédit par utilisation d'un modèle QSAR que la répartition des IC_{50} des différents peptides était similaire dans les produits digérés. A ce jour, aucune étude n'a montré un impact de la fermentation du lait par des Lactobacilles sur l'inhibition de la DPP-IV. Les protéines laitières sont pourtant bien connues comme des sources de peptides inhibiteurs de cette enzyme (Lacroix & Li-Chan, 2014; Nongonierma *et al.*, 2017; Nongonierma & FitzGerald, 2013). Ceci pourrait souligner l'incapacité de souches de *Lactobacillus* à produire des peptides inhibiteurs de la DPP-IV et une hypothèse pouvant expliquer ce constat peut être avancée. La DPP-IV est une exopeptidase à sérine et son inhibition est principalement due à la présence d'inhibiteurs compétitifs c'est-à-dire que les peptides inhibiteurs possèdent des sites de clivages de l'enzyme rendant l'inhibition possible par compétition avec d'autres substrats (Nongonierma & Fitzgerald, 2017). En comparaison, les CEPs sont également des protéases à sérine ce qui suggère que les sites de coupures

préférentiels entre les protéases pariétales des *Lactobacilles* et la DPP-IV sont proches. Les *Lactobacilles* vont en effet hydrolyser les protéines au niveau des sites destinés à l'inhibition de la DPP-IV ce qui pourrait expliquer l'incapacité des souches à produire des peptides inhibiteurs de l'enzyme. De plus, la peptidase PepX présente au sein du système protéolytique des bactéries, possède une importante homologie avec la DPP-IV au niveau du site actif impliquant une activité enzymatique similaire et conservée au cours de l'évolution (Rigolet *et al.*, 2005). Cela vient appuyer l'hypothèse selon laquelle les souches de *Lactobacilles* sont incapables de produire des peptides inhibiteurs de la DPP-IV. La théorie implique donc que plus une souche possède une activité protéolytique, moins elle sera capable de produire des peptides inhibiteurs de la DPP-IV. Les résultats obtenus montrent que la souche *L. helveticus* 45a ayant présenté la meilleure activité protéolytique des 3 souches, a produit le fermentât le moins inhibiteur de la DPP-IV, et inversement pour la souche *L. helveticus* 49d, qui elle présente une inhibition similaire au contrôle lait.

En lien direct avec l'inhibition de la DPP-IV, les fermentâts étudiés n'ont pas conduit à une stimulation de la sécrétion du GLP-1 par les cellules intestinales en comparaison avec la condition contrôle. La stimulation observée pour le contrôle lait est probablement due à la présence de lactose dans le produit en concentration plus importante que dans les produits fermentés par les souches bactériennes. Ce disaccharide est en effet bien connu comme stimulateur de la sécrétion du GLP-1 (Inabu *et al.*, 2017). Ces résultats montrent que la fermentation par des souches de *L. helveticus* ne confère pas d'effet stimulateur de la sécrétion du GLP-1 au produit résultant. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus au cours d'une étude clinique qui n'a pas montré d'impact significatif d'un lait fermenté par une coculture de *L. acidophilus* et *Lactococcus cremoris* sur la sécrétion du GLP-1 en comparaison avec le lait non fermenté (Sanggaard *et al.*, 2004).

Dans ce projet, la capacité des produits fermentés à moduler l'absorption du calcium a été évaluée *in vitro* sur cellules intestinales Caco-2 en évaluant l'incorporation du calcium et la modulation de l'expression du gène codant pour le transporteur du calcium (TRPV6). Les résultats ont montré que tous les produits issus de la fermentation bactérienne, à l'exception du F45a UFP I2, étaient capables d'améliorer l'incorporation du calcium au sein des cellules intestinales en comparaison avec le produit contrôle. De plus, une augmentation de l'expression du gène *trpv6* a été observée après un contact de 7 h entre les fermentâts bruts digérés et les cellules Caco-2, un effet important du fermentât produit par la souche *L. helveticus* 49d a d'ailleurs été constaté. Ces travaux montrent l'impact des produits fermentés sur l'absorption

du calcium au niveau intestinal. Cependant les expérimentations réalisées ne permettent pas de prouver que cet effet est lié à la production de peptides. En effet, l'absorption du calcium est un phénomène complexe mettant en jeu plusieurs voies d'absorption et pouvant être impacté par plusieurs types de molécules (Pu *et al.*, 2016). Par exemple, même si le mécanisme d'action est encore inconnu, le lactose présente la capacité d'améliorer l'absorption du calcium (Kwak *et al.*, 2012). L'importante quantité de lactose présente dans le lait non fermenté pourrait d'ailleurs expliquer son effet observé sur l'absorption du calcium. L'effet des fermentats pourrait également être dû à la production de SCFAs ou encore de lactate, ces molécules étant capables d'améliorer les fonctions de la barrière intestinale ou encore d'augmenter le nombre de microvillosités et donc la surface d'absorption (Rizzoli & Biver, 2017). Il est cependant peu probable que l'activité soit liée à la production de phosphopeptides de caséines (CPPs). En effet l'activité de ces peptides a largement été étudiée *in vitro* sur cellules intestinales Caco-2 ou HT-29 MTX (Cosentino *et al.*, 2010b; Cross *et al.*, 2005; Ferraretto *et al.*, 2001; Gravaghi *et al.*, 2007; Perego *et al.*, 2015). Les travaux de Colombini *et al.*, (2013) et de Perego *et al.*, (2013) ont mis en évidence une implication directe des CPPs sur l'incorporation du calcium impliquant le transporteur TRPV6. Au cours de ce projet, l'évaluation de l'incorporation du calcium par les cellules intestinales a été réalisée en l'absence de ces peptides, puisque les cellules ont subi un lavage entre le contact avec le fermentât et la mesure de l'incorporation du calcium ce qui implique que les CPPs ne sont pas impliqués dans l'activité observée. De plus, ces mêmes auteurs (Colombini *et al.*, 2013; Perego *et al.*, 2013) ont reporté l'absence d'effets des CPPs purifiés sur l'expression de TRPV6 *in vitro*, suggérant qu'un autre mécanisme peut être responsable de la modulation du gène *trpv6* observée dans cette étude. Il est enfin très probable que l'activité des fermentats bactériens vis-à-vis de l'absorption du calcium, soit liée à une synergie de différentes molécules présentes dans ces produits complexes. Dans tous les cas, l'approfondissement des travaux en lien avec cette activité est nécessaire pour la compréhension de l'impact des laits fermentés produits par les souches de *L. helveticus* sur l'absorption du calcium.

La dernière activité biologique étudiée pour la valorisation des produits fermentés est l'inhibition de l'ACE. Il s'agit d'une activité largement reportée pour des produits fermentés par les Lactobacilles (Alhaj *et al.*, 2018; Fernandez *et al.*, 2017; Georgalaki *et al.*, 2017; Kliche *et al.*, 2017; Solanki *et al.*, 2017) et de nombreux peptides inhibiteurs ont été identifiés à partir de ces produits (Li *et al.*, 2017a; Pihlanto, 2013). Les tripeptides IPP et VPP sont les inhibiteurs les plus connus de l'ACE retrouvés dans les laits fermentés et notamment ceux produits par *L.*

helveticus (Chen *et al.*, 2014; Wakai & Yanamoto, 2012). L'activité des produits fermentés sur l'inhibition de l'ACE a été constatée dans les résultats obtenus, les 3 fermentats bactériens bruts ont présentés une capacité d'inhibition supérieure à celle du contrôle ce qui est en accord avec la littérature. L'utilisation d'un modèle QSAR a d'ailleurs permis de prédire ces activités, les proportions de peptides prédits comme les plus inhibiteurs étant en effet plus importantes dans les fermentats bactériens que dans le contrôle lait. Les proportions de peptides ayant une IC_{50} prédites entre 0 et 50 μM sont d'ailleurs corrélées aux IC_{50} déterminées par le test d'inhibition ce qui prouve la pertinence du modèle QSAR utilisé dans ce projet. L'approche conduite dans cette étude à savoir, la réalisation d'un contrôle lait et la simulation d'une DGI, ont permis de mesurer la portée de cette activité *in vitro*. En effet, la digestion simulée sur les produits bruts a masqué l'activité des fermentats bactériens en comparaison avec le contrôle lait, la consommation d'un lait fermenté avec ces Lactobacilles n'aurait donc pas plus d'intérêt que la consommation du lait vis-à-vis de l'inhibition de l'ACE. Ce résultat n'est pas surprenant, d'une façon générale la DGI de protéines laitières augmente la libération de peptides inhibiteurs de l'ACE. En outre, les protéines non hydrolysées au cours de la fermentation subissent l'action des enzymes digestives (Hernández-Ledesma *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2016; Matar *et al.*, 1996). Ces observations remettent en question le potentiel des Lactobacilles à fonctionnaliser les produits laitiers et ainsi produire des inhibiteurs de l'ACE. Les faibles quantités de peptides produites par les bactéries au cours de la fermentation sont en effet bien inférieures aux quantités produites lors de la DGI (Daliri *et al.*, 2017). Cela entraîne une réduction de l'hétérogénéité peptidique entre un produit fermenté et son équivalent non fermenté après DGI. La comparaison des séquences peptidiques après analyse par spectrométrie de masse a confirmé cet impact de la digestion sur l'harmonisation des produits fermentés. De plus, le modèle QSAR a encore une fois montré une bonne capacité de prédiction de l'activité des différents produits. Tandis que l'impact de la fermentation était visible avant digestion, une homogénéisation dans la répartition des IC_{50} prédites pour les séquences peptidiques a été observée entre les 4 produits après DGI.

Dans le but de prévenir l'impact de la digestion sur l'inhibition de l'ACE, une ultrafiltration des fermentats a été réalisée afin de séparer les peptides produits par les souches bactériennes des protéines non hydrolysées durant la fermentation. La séparation par filtration est couramment utilisée (Han *et al.*, 2012; Hayes *et al.*, 2006). L'ultrafiltration n'a pas sensiblement modifié l'activité des produits, l'activité des fermentats bactériens étant toujours supérieure au contrôle lait. De plus, l'impact de la fermentation a été conservé après la DGI des produits

ultrafiltrés, les peptides extraits du fermentât produit par la souche *L. helveticus* 45a ont montré une capacité d'inhibition de l'ACE supérieure à celle observée pour le contrôle lait. La digestion n'a pas modifié les profils peptidiques des fermentâts bactériens ce qui semble être confirmé par le maintien de leur activité, cela est probablement dû aux séquences peptidiques de faibles poids moléculaires résistantes à la DGI. En effet, les peptides inhibiteurs de l'ACE IPP et VPP ont d'ailleurs été identifiés comme résistants à la digestion (Ohsawa *et al.*, 2008). La diminution de l'IC₅₀ du contrôle lait après digestion est probablement due à la production de peptides au cours de l'autolyse des enzymes digestives. Ces travaux ont permis de mettre en évidence la capacité de la souche *L. helveticus* 45a à produire des peptides inhibiteurs de l'ACE. La semi-purification du fermentât est néanmoins nécessaire pour obtenir un effet significativement supérieure au produit non fermenté. La fragmentation de cet hydrolysât pourra conduire à l'identification des peptides impliqués dans l'activité biologique (Sharma *et al.*, 2011), et à la mise en évidence de nouvelles séquences peptidiques non caractérisées aujourd'hui. En se référant à l'analyse QSAR réalisée au cours de ce projet, le F45a brut contiendrait un certain nombre de peptides ayant de faibles IC₅₀ prédites. A titre de comparaison, les peptides IPP et VPP ayant des IC₅₀ respectives de 5 et 9 μM (Wakai & Yanamoto, 2012) ont une IC₅₀ prédite de 26,85 μM par le modèle QSAR utilisé durant ce projet. Au total, 5 séquences peptidiques identifiées dans le fermentât brut produit par la souche *L. helveticus* 45a présentent une IC₅₀ inférieure à cette valeur, ces séquences ne sont d'ailleurs pas recensées dans la base de données BIOPEP (Minkiewicz *et al.*, 2008).

A partir de ces résultats, la souche *L. helveticus* 45a a été choisie afin de développer un procédé de production en continu du produit d'intérêt. L'une des limitations à l'utilisation des Lactobacilles pour la production de peptides bioactifs est en effet le manque de procédés viables industriellement et/ou commercialement (Agyei *et al.*, 2016). L'utilisation d'un bioréacteur couplé à une membrane de microfiltration présente plusieurs avantages comme la possibilité de produire un ingrédient directement actif en une seule étape couplant la production et la semi-purification. De plus, un rendement supérieur du procédé de production en continu peut être envisagé en comparaison avec une production en mode batch, les cellules bactériennes et les protéines étant concentrées dans le bioréacteur. Les seules études ayant développées un tel procédé à partir de Lactobacilles, se sont focalisées sur la production d'acide lactique et non de peptides (Boyaval *et al.*, 1988; Choudhury & Swaminathan, 2006; Jung & Lovitt, 2010; Taleghani *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2006). Dans cette étude, une importante quantité d'acide lactique a d'ailleurs été reportée dans la cuve produit. Bien que les résultats obtenus ont montré

une production plus importante de peptides, la productivité moyenne du procédé est inférieure à celle des fermentations réalisées en batch ($0,27 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ de peptides en BRM contre $0,66 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ en mode batch) si la quantité de peptides produite est rapportée à la quantité de matière première (lait) utilisée pour le fonctionnement du procédé. D'après les résultats obtenus, il a été calculé que 5,3 fermentations en mode batch de 24 h (soit plus de 120 h au total) sont requises pour aboutir à la même quantité de peptides produits au cours d'un procédé en continu dans un BRM fonctionnant pendant 72 h. Un tel procédé, bien que moins productif, est donc avantageux en termes de temps de préparation et de réalisation en comparaison avec un fonctionnement de type batch, le procédé pouvant être mis en œuvre pendant une durée théoriquement infinie, la préparation répétée de procédé en batch est évitée. Il a été observé que le taux de dilution utilisé ($0,1 \text{ h}^{-1}$, débit d'alimentation à 5 mL.min^{-1}) conduit à une limitation de la croissance bactérienne du fait vraisemblablement d'un manque d'alimentation en lactose dans le bioréacteur. Les cellules consomment en effet une importante quantité de lactose au cours des premières 24 h de culture, ce substrat n'est par la suite, pas apporté en quantité suffisante durant la phase continue. Ainsi, après doublement de la concentration bactérienne après 48 h de culture, cette croissance est stabilisée à cause du faible apport de lactose dans le bioréacteur en comparaison à la biomasse. La mise au point des conditions notamment le taux de dilution appliqué pendant la phase continue permettra d'améliorer le procédé du point de vue de la croissance bactérienne et *in fine* de la production de peptides. L'atomisation du produit de fermentation a permis de compléter le procédé en aboutissant à un produit stable et toujours actif vis-à-vis de l'inhibition de l'ACE. L'ensemble des résultats obtenus montrent la faisabilité d'un tel procédé pour la production de peptides bioactifs à partir de Lactobacilles.

Chapitre 5

Discussion générale

L'objectif principal de ce projet est de développer des ingrédients actifs issus de Lactobacilles et utilisables pour la prévention de l'ostéoporose. Dans ce but, une collection de plus de 170 souches de Lactobacilles isolés en Mongolie, a été constituée par la société VF Bioscience. Le projet s'est articulé autour de deux approches traitées de façon indépendante, l'une consistant à utiliser les Lactobacilles pour la production de peptides bioactifs et la seconde utilisant les souches comme probiotiques. Deux criblages ont été réalisés afin de sélectionner des souches potentiellement utilisables pour les deux approches. Ces criblages ont été réalisés sur base de critères simples, ceci afin de sélectionner rapidement des souches candidates.

Le criblage de la collection en vue de la sélection de souches probiotiques a été réalisé selon des caractéristiques intrinsèques des Lactobacilles telles que l'hydrophobie pariétale et la tolérance à l'acidité. L'hydrophobie pariétale, bien que déterminante du potentiel d'adhésion des souches aux cellules intestinales (Sengupta *et al.*, 2013), ne s'est pas révélée ici être un critère pertinent pour la prédiction de l'adhésion des bactéries à l'épithélium intestinal. Pour exemple, la souche *L. casei* 9b a présenté un des pourcentages d'hydrophobie pariétale le plus élevé parmi toutes les souches de la collection tandis que sa capacité d'adhésion aux cellules intestinales Caco-2 était particulièrement faible.

De la même manière, le criblage de la collection pour la sélection de souches protéolytiques a été réalisé sur gélose au lait. L'idée était de sélectionner des souches ayant des capacités protéolytiques élevées et donc à priori plus à même de produire une importante quantité de peptides. Comme toute méthode de criblage, elle ne peut intégrer tous les paramètres et ne tient pas compte de la capacité de fermentation des souches puisque les cultures sont réalisées sur milieu solide, de plus la diversité peptidique n'étant pas étudiée, des souches présentant des spécificités enzymatiques originales vis-à-vis des protéines peuvent ne pas avoir été sélectionnées. Ces caractéristiques des souches ont ensuite été mises en évidence lors de l'analyse multiparamétrique. Une telle étude permet d'apprécier l'ensemble des paramètres liés à la protéolyse des souches en lait écrémé et peut s'appliquer à d'autres substrats protéiques.

Dans le cadre de la production de peptides bioactifs par les Lactobacilles, l'une des problématiques principales est la sélection des souches d'intérêts. Le caractère empirique de l'approche conventionnelle pour la recherche de peptides bioactifs est ici plus prononcé car la sélection est souvent réalisée parmi un grand nombre de souches. Ce constat a conduit à une réflexion sur le développement d'une méthodologie permettant de sélectionner de manière pertinente des souches de Lactobacilles en vue de la production de peptides bioactifs. Cette méthode s'inscrit dans le cadre de l'approche intégrée de découverte des peptides bioactifs

(Udenigwe, 2014). Elle combine en effet des techniques conventionnelles avec l'utilisation d'outils bio-informatiques permettant une sélection pertinente des souches bactériennes (Figure 89).

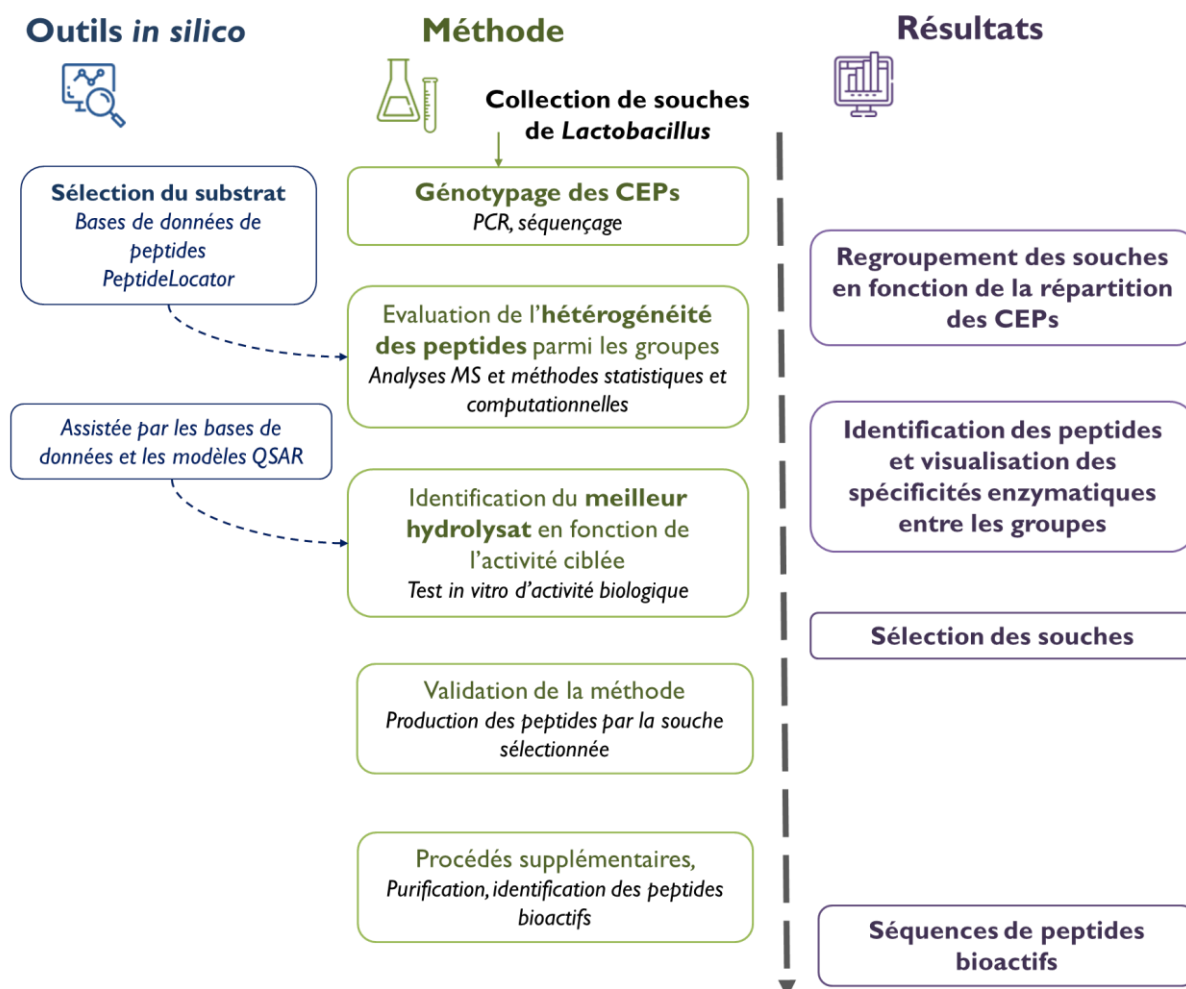


Figure 89 : Représentation schématique de la méthodologie proposée pour la sélection de souches de *Lactobacilles* en vue de la production de peptides bioactifs.

Après génotypage des CEPs, l'hétérogénéité des peptides produits par les souches est évaluée. L'hydrolysats est ensuite choisi en fonction de l'application ciblée. Finalement la méthode est validée par utilisation de la souche correspondante afin de produire l'hydrolysats d'intérêt. Différents outils bio-informatiques peuvent être utilisés au cours de la méthodologie.

En premier lieu, il est important d'évaluer les diversités inter ou intra spécifique des CEPs dans une collection de *Lactobacilles* donnée. La répartition des CEPs va en effet conditionner la diversité des profils peptidiques générés, ce qui est particulièrement applicable aux souches de *L. helveticus* du fait de la présence de 4 paralogues de *prtH*. La diversité génétique des CEPs peut être évaluée par PCR (Genay *et al.*, 2009), par PCR multiplex (Broadbent *et al.*, 2011) ou encore par séquençage génomique (Sun *et al.*, 2015). A ce jour, seulement 4 CEPs ont été

caractérisées pour le genre *Lactobacillus* (PrtB, PrtP, PrtR, PrtH et ses paralogues), de futures études devront être entreprises afin de caractériser de nouvelles CEPs issues de différentes espèces. Le génotypage des CEPs conduit au regroupement des souches ou isolats en fonction de la répartition des enzymes. Si jamais l'identification des CEPs est impossible, des souches de la même espèce seront regroupées ensemble. Au final, le nombre de groupes formé reflète le nombre probable de profils protéolytiques différents.

Le choix de la source protéique peut être pris de la même façon que pour l'approche intégrée de recherche des peptides bioactifs. Les outils bio-informatiques peuvent ainsi assister cette décision. Néanmoins, l'utilisation du logiciel PeptideCutter (Gasteiger *et al.*, 2005) n'est ici pas applicable, car les CEPs du genre *Lactobacillus* ne sont pas représentées dans le programme, probablement du fait d'un manque de caractérisation de ces enzymes.

La sélection de la protéine ou de la source protéique est suivie de l'identification des peptides libérés par celle-ci après incubation avec des souches bactériennes présentant différentes CEPs (quelques souches sont sélectionnées pour chaque groupe de CEPs). Cela permettra d'évaluer la diversité protéolytique des souches composant une collection. Par utilisation des techniques de spectrométrie de masse, les analyses peptidomiques conduisent à la caractérisation fine des capacités protéolytiques des souches sélectionnées ou de leurs CEPs (Dallas *et al.*, 2016; Giacometti & Buretić-Tomljanović, 2017; Hernández-Ledesma *et al.*, 2004). Une fois que les peptides sont identifiés dans les différentes conditions, la cartographie des peptides sur la protéine d'origine permet de visualiser les régions préférentiellement hydrolysées par différentes CEPs (Dallas *et al.*, 2015). De plus, différentes représentations ou analyses statistiques permettent de comparer les distributions différentielles des peptides dans des hydrolysats différents, à savoir, le diagramme de Venn, l'analyse en composantes principales (ACP), la régression linéaire multiple, le réseau de neurones artificiels ou la régression par les moindres carrés partiels (Dallas *et al.*, 2016; Iwaniak *et al.*, 2015; Jin *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017a). Par cette approche, une corrélation entre les CEPs identifiées et les peptides produits au cours de l'incubation devrait être observée. Dans ce projet, ce type d'approche a été réalisé au cours de l'analyse multiparamétrique, une ACP a en effet permis d'apprécier la corrélation entre les génotypes de CEPs et les peptides libérés au cours de la fermentation.

La sélection de souches de Lactobacilles est aussi basée sur le potentiel bioactif des peptides produits au cours de l'incubation avec la protéine d'intérêt. Dans ce but, des analyses bio-informatiques peuvent prédire une activité biologique pour les hydrolysats produits. L'utilisation des bases de données de peptides bioactifs (Minkiewicz *et al.*, 2008; Nielsen *et al.*,

2017) ainsi que des modèles QSAR (Iwaniak *et al.*, 2015; Nongonierma & FitzGerald, 2017b) peuvent permettre de sélectionner un hydrolysats prometteur et par conséquent une souche bactérienne productrice.

La prochaine étape consisterait à produire des hydrolysats aux bioactivités ciblées, au moyen des souches de Lactobacilles correspondantes. La validation de la méthodologie proposée ici doit ensuite être entreprise par une étude *in vitro* afin de confirmer les prédictions *in silico*. Si la méthodologie proposée conduit à l'obtention d'un hydrolysats actif avec succès, l'optimisation des conditions de fermentation ou d'hydrolyse permettront d'améliorer le rendement de production. Dans cet objectif, un milieu de composition défini a été développé pour augmenter l'activité protéolytique de la souche *L. delbrueckii* 761N (Nour *et al.*, 2014). Ces optimisations peuvent également être assistées par des outils bio-informatiques tels que les plans d'expériences (Design Of Experiments, DOE) suivis d'une méthode des surfaces de réponses (Response Surface Methodology, RSM), ceci afin d'améliorer la production de peptides bioactifs (Nongonierma & FitzGerald, 2017a; Sánchez-Rivera *et al.*, 2014) ou de CEPs (Kurniati *et al.*, 2015). Les travaux réalisés au cours de ce projet ont conduit à la proposition de cette méthodologie de sélection des Lactobacilles pour la production de peptides bioactifs (Raveschot *et al.*, 2018), de futurs travaux permettront sans doute de vérifier son efficacité.

Après réalisation des différents criblages de la collection, certaines souches ont été sélectionnées pour la continuité de chaque approche expérimentale. Après caractérisation des souches probiotiques ou encore production d'hydrolysats peptidiques, les bénéfices santé potentiels de ces ingrédients ont été évalués *in vitro*. L'étude des activités biologiques des probiotiques ou hydrolysats peptidiques réalisés au cours de ce projet ont été réalisés en combinant des tests biochimiques et des études sur cultures cellulaires. L'impact des ingrédients a été évalué au niveau intestinal, les interactions au niveau intestinal entraînant des répercussions sur d'autres processus physiologiques notamment le métabolisme osseux. Ces choix ont été conduits pour être au plus proche des conditions *in vivo* et sont particulièrement justifiés pour l'utilisation des probiotiques mais également pour les peptides bioactifs. En sachant que leur temps de demi vie dans la circulation systémique est court du fait des protéases et peptidases humaines (Miner-Williams *et al.*, 2014), la bioactivité des peptides aura surtout lieu au niveau intestinal. Dans ce contexte, une approche originale a été utilisée pour étudier les activités biologiques des hydrolysats peptidiques. Ainsi, pour mettre en évidence l'impact de la fermentation sur le bénéfice santé potentiel, la combinaison d'une simulation de la DGI *in vitro* et la réalisation d'un contrôle non fermenté a été entreprise. Ces études ont permis de mettre en

évidence les activités biologiques de souches probiotiques ou des hydrolysats peptidiques produits par des souches spécifiques. Il reste bien évidemment à prouver le bénéfice de ces activités sur le métabolisme osseux et notamment leur capacité à prévenir l'apparition d'un syndrome ostéoporotique. Ces études devront être réalisées *in vivo* (Parvaneh *et al.*, 2014), ou en tout cas par le développement de nouveaux modèles cellulaires combinant cellules intestinales et cellules osseuses afin de s'approcher encore plus de la réalité physiologique. Une co-culture de cellules intestinales Caco-2 sur inserts et d'ostéoblastes MG-63 du côté basal de l'insert constitue une piste de développement de ces modèles. Après contact des ingrédients actifs sur les cellules intestinales, l'étude de la calcification des ostéoblastes permettra de confirmer l'impact des probiotiques ou des peptides sur le métabolisme du calcium et *in fine* sur la minéralisation des os.

En conclusion, les résultats des études des activités biologiques ont conduit à la mise en évidence de plusieurs souches de Lactobacilles pouvant être utilisées pour le développement d'ingrédients bioactifs (**Figure 90**).

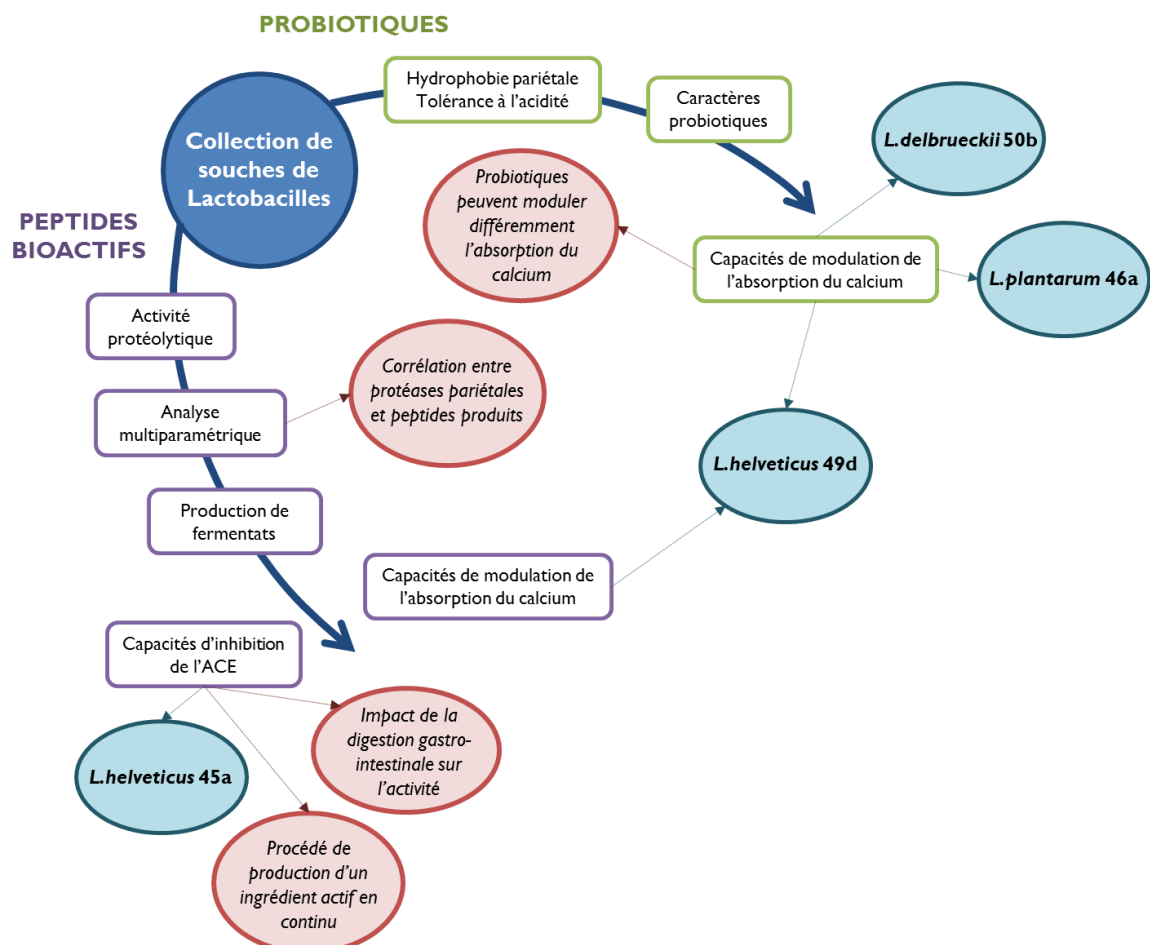


Figure 90 : Schéma récapitulatif des travaux réalisés, des résultats marquants et des souches mises en évidence.

Les souches *L. plantarum* 46a et *L. delbrueckii* 50b ont démontré un potentiel probiotique de par leurs capacités à moduler l'absorption du calcium par les cellules intestinales, les voies d'absorption modulées ont d'ailleurs pu être mises en évidence. Ces souches impactent respectivement les voies transcellulaire et paracellulaire de l'absorption du calcium. La souche *L. helveticus* 45a a quant à elle montré sa capacité à produire des peptides bioactifs inhibiteurs de l'ACE par fermentation du lait. Enfin une particularité de la souche *L. helveticus* 49d a pu être mise en évidence au cours de ce projet. Cette souche a été sélectionnée à la fois pour ces propriétés probiotiques mais également pour ses capacités protéolytiques. Par la suite, la souche a démontré des capacités intéressantes : son action probiotique sur l'absorption du calcium et sa capacité à fonctionnaliser le lait par fermentation pour former un produit ayant cette même capacité de modulation du métabolisme du calcium. Il s'agit ainsi de la même activité biologique, issue de la même souche mais utilisée de façons différentes. Il est probable que la souche *L. helveticus* 49d possède un métabolisme particulier permettant de produire des métabolites capables d'impacter l'absorption intestinale du calcium, que ce soit au cours de la fermentation du lait ou d'un contact sur cellules intestinales. La caractérisation du métabolisme de la souche dans différentes conditions permettrait de comprendre son mécanisme d'action. Au final, parmi les 170 souches bactériennes de la collection, 4 souches ont pu être sélectionnées pour leur utilisation potentielle en tant qu'ingrédients actifs. D'un point de vue industriel, la valorisation de la collection de Mongolie constitue un objectif primordial du projet de thèse. En plus de l'identification des capacités de ces 4 souches, la démonstration de la faisabilité d'un procédé de production d'un ingrédient actif en continu a été réalisée, mettant en évidence une potentielle application industrielle de ces travaux de recherche.

Les résultats de ce projet ont révélé des points fondamentaux améliorant la compréhension de certains mécanismes et phénomènes liés à la production de peptides bioactifs ou à l'étude des probiotiques (**Figure 90**). En effet, l'impact *in vitro* de souches probiotiques sur l'absorption du calcium par les cellules intestinales est une activité peu explorée. Une telle étude permet de comprendre les mécanismes mis en jeu. Au regard des résultats, il semble que les Lactobacilles soient capables de moduler différentes voies d'absorption du calcium. Ceci suggère l'existence de plusieurs modes d'actions des souches de Lactobacilles conduisant à un impact sur le métabolisme du calcium. Des analyses *in vivo* permettraient de mesurer la portée de cette activité sur le métabolisme osseux et en particulier pour la prévention de l'ostéoporose. La première étude clinique démontrant l'impact de probiotiques sur le métabolisme osseux est

toute récente (Nilsson *et al.*, 2018), de nombreuses études sont encore à entreprendre afin de démontrer le potentiel des probiotiques comme médiateurs des fonctions du système osseux.

Concernant l'activité protéolytique des Lactobacilles, une corrélation entre les génotypes des CEPs et les peptides produits a pu être observée par une approche peptidomique originale combinant la construction de cartes de chaleurs et la comparaison de celles-ci par ACP. Ces résultats montrent l'importance des protéases pariétales dans les profils peptidiques générés par les souches bactériennes (Hafeez *et al.*, 2014), ainsi que l'intérêt des approches peptidomiques dans l'étude de ces spécificités protéolytiques.

Par la suite, l'impact de la DGI sur l'activité inhibitrice de l'ACE des hydrolysats peptidiques a pu être mesuré. D'après les résultats, la consommation d'un lait fermenté n'apporte pas d'avantages en comparaison d'un lait non fermenté vis-à-vis de l'inhibition de l'ACE. Cela est probablement dû à l'hydrolyse par les enzymes gastro-intestinales des protéines contenues dans le fermentât brut, conduisant à une homogénéisation des profils peptidiques entre un lait digéré et le même lait préalablement fermenté. Ces observations ont été confirmées par les analyses QSAR. Les résultats montrent que la DGI modifie profondément le contenu peptidique des hydrolysats produits par les souches, affectant l'activité réelle *in vivo*. Les faibles quantités de peptides produits par les Lactobacilles au cours de la fermentation pourraient expliquer en partie ce phénomène (Daliri *et al.*, 2017).

Enfin, le développement d'un procédé de production d'un hydrolysat actif en continu constitue une approche prometteuse de valorisation des Lactobacilles. Un tel procédé a pu être réalisé durant ce projet, les résultats ont d'ailleurs démontré sa faisabilité même si des optimisations sont nécessaires notamment au niveau des conditions appliquées lors de la phase continue, comme par exemple le taux de dilution lors d'un procédé avec recyclage total des cellules. La recherche sur les peptides bioactifs souffrant d'un manque de procédés de production viables industriellement (Agyei *et al.*, 2016), les Lactobacilles pourront être utilisés afin de développer à l'avenir des méthodes de production plus économiques.

En résumé, ce projet de thèse a permis la valorisation de la collection de Mongolie au moyen de deux approches. Les travaux concernant l'utilisation de probiotiques ont permis de mettre en évidence deux souches modulant différentes voies d'absorption du calcium. En parallèle, une souche a permis de produire par fermentation, un hydrolysat peptidique contenant des peptides inhibiteurs de l'ACE. L'impact de la DGI sur l'activité de l'hydrolysat a été démontré, et une extraction préalable des peptides du milieu de fermentation apparaît nécessaire pour

obtenir une activité significative. De plus, un procédé de production en continu d'un hydrolysât a été réalisé. Enfin, une souche particulière a montré des capacités à la fois en tant que probiotique et en tant que productrice d'un produit fermenté, actifs vis-à-vis de l'absorption du calcium. Les Lactobacilles sont sources de nombreux ingrédients santé, la prédominance ainsi que l'origine particulière du genre *Lactobacillus* au sein de la collection de Mongolie illustrent les nombreuses possibilités de valorisation de cette collection. Ces souches particulières peuvent encore être étudiées pour leurs capacités de production de certaines vitamines (Capozzi *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2017b). Mais également pour la production d'exopolysaccharides, des oligosaccharides aux multiples propriétés, les souches de *L. kefiranofaciens* sont toutes indiquées pour une telle approche de valorisation (Jeong *et al.*, 2017).

Chapitre 6

Perspectives

I. Combinaison des approches, développement d'un yaourt ou lait fermenté bi-fonctionnel

Les deux démarches expérimentales adoptées pour mener à bien les objectifs de ce projet à savoir, la caractérisation de probiotiques et la production de peptides bioactifs, ont été conduites indépendamment. La combinaison de ces approches peut être envisagée pour développer un ingrédient ou plus particulièrement un produit alimentaire contenant à la fois des peptides bioactifs et des souches probiotiques.

Le produit fermenté le plus populaire pour la distribution de souches probiotiques est le yaourt. Il est strictement défini comme un lait fermenté par les deux starters de fermentation *L. delbrueckii* et *Streptococcus thermophilus* qui doivent être viables et actifs dans le produit fini. Ces starters peuvent d'ailleurs être considérés comme probiotiques puisqu'ils contribuent en partie à l'amélioration de la digestion du lactose chez les personnes intolérantes (FAO/WHO, 2011). Cependant, ces souches sont peu résistantes à la DGI, remettant en question leur statut de probiotiques (Vinderola & Reinheimer, 2003). Les termes yaourt fonctionnel ou produit type-yaourt sont utilisés afin de définir une culture alternative aux starters traditionnels du yaourt. Ces produits sont issus de la fermentation du lait par d'autres souches ou espèces, par exemple, *L. delbrueckii* peut être substitué par un autre Lactobacille ou des souches probiotiques peuvent être utilisées afin de produire un yaourt (Rutella *et al.*, 2016b). Ainsi les yaourts fonctionnels représentent une voie alternative d'administration de souches probiotiques. Les aliments fonctionnels sont d'ailleurs mieux acceptés par les consommateurs que les nutraceutiques ou compléments alimentaires (Granato *et al.*, 2010). En plus de pouvoir véhiculer des probiotiques, le mode de production des yaourts, la fermentation, peut conduire à la libération de peptides bioactifs dans le produit fini (Fernandez *et al.*, 2017; Jin *et al.*, 2016).

Dans ce contexte, la conception de yaourts bi-fonctionnels constitue une approche prometteuse pour le développement d'aliments santé par utilisation d'une combinaison de souches probiotiques et de souches capables de libérer des peptides bioactifs. Le procédé de fermentation permettra à la fois de produire les peptides bioactifs ou leurs précurseurs mais également de permettre le développement de la souche probiotique. En outre, la matrice yaourt peut également conférer une protection aux cellules bactériennes vis-à-vis des conditions drastiques de l'estomac subies lors de la digestion, permettant à la souche probiotique d'atteindre l'intestin avec un nombre de cellules viables suffisant pour exercer une activité biologique (Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001). Les travaux de Rutella *et al.*, (2016b) ont

permis de développer de deux yaourts bi-fonctionnels fabriqués à partir des starters traditionnels en combinaison avec les souches *L. rhamnosus* PRA331 ou *L. casei* PRA205. Ce dernier a d'ailleurs été rapporté comme possédant d'importantes activités antioxydantes et d'inhibition de l'ACE.

Pour ce projet, le développement d'un tel yaourt pourrait être envisagé et ainsi la production d'un aliment fonctionnel destiné à la prévention de l'ostéoporose ou au maintien des fonctions du système osseux. La collection de Mongolie a en effet été criblée à la fois pour des souches probiotiques et pour des souches capables de libérer des peptides bioactifs. La combinaison des approches pourrait ainsi conduire à la conception d'un yaourt bi-fonctionnel. Pour un tel projet, les résultats obtenus au cours des travaux réalisés dans le cadre de cette étude permettent d'identifier la souche à utiliser, le *L. helveticus* 49d. Elle a démontré ses capacités en tant que probiotique et en tant que potentiel producteur de métabolites favorisant l'absorption du calcium. Elle est donc toute indiquée pour la production d'un yaourt fonctionnel capable d'améliorer l'absorption du calcium et de prévenir les états d'hypocalcémies. A l'avenir, différentes combinaisons de souches pourront être testées autour de la souche *L. helveticus* 49d afin de produire des yaourts conférant des effets bénéfiques sur la santé.

II. Limites et challenges pour la production de peptides bioactifs par les Lactobacilles

De nombreux travaux ainsi que ceux réalisés au cours de ce projet, montrent le potentiel des Lactobacilles à libérer des peptides bioactifs variés. L'utilisation des Lactobacilles présente néanmoins certains challenges qu'il s'agit de relever. En premier lieu, la sélection des souches à utiliser pour la production de peptides peut se révéler fastidieuse notamment dans le cas où le nombre de souches disponibles est élevé. Une stratégie de sélection des Lactobacilles en vue de la production de peptides bioactifs a été proposée dans ce manuscrit, elle comporte cependant certaines limites. En effet, les CEPs du genre *Lactobacillus* sont encore mal caractérisées. Un faible nombre de protéases pariétales a été identifié et les spécificités de ces différentes CEPs ne sont pas encore clairement établies. Cela est probablement dû aux différences observées entre plusieurs études en termes de modèles protéiques et d'espèces de Lactobacilles considérées. A l'instar de l'analyse multiparamétrique réalisée au cours de ce projet, le besoin de générer des données à grande échelle sur les capacités de fermentation et les activités protéolytiques de différentes souches et espèces de Lactobacilles est réel. Cela a par exemple été réalisé via une approche de comparaison génomique à partir de 213 souches de Lactobacilles (Sun *et al.*, 2015) mais la nécessité d'entreprendre d'autres études dans ce domaine est évidente. A ce jour et de manière surprenante, aucune analyse comparative de génomes de différentes souches de *L. helveticus* n'a été réalisée (Stefanovic *et al.*, 2017) alors que l'espèce est considérée comme la plus protéolytique au sein du genre *Lactobacillus*.

En plus de la caractérisation des CEPs, les approches de peptidomiques (chromatographie, spectrométrie de masse et bio-informatique) conduisent à une détermination précise et relativement rapide de l'hétérogénéité des peptides produits par fermentation et ainsi des capacités des CEPs à libérer des séquences spécifiques. Combinées à des méthodes computationnelles (ACP, régression linéaire multiple, réseau de neurones artificiels ou régression par les moindres carrés partiels), ces analyses permettent de visualiser les régions préférentielles d'hydrolyse des protéines par différentes souches de Lactobacilles et l'activité de leurs CEPs. Ces outils statistiques sont nécessaires afin de gérer la quantité de données générée par les approches peptidomiques et ainsi interpréter facilement la présence de milliers de séquences peptidiques au sein de différents échantillons (Dupont, 2017). Les données collectées pourraient d'ailleurs servir à concevoir une base de données dédiée aux produits de fermentation (Giacometti & Buretić-Tomljanović, 2017) en particulier pour les protéines de

lait. En outre, certaines améliorations dans l'analyse des peptidomes seront nécessaires pour la caractérisation des petits peptides (notamment les di et tripeptides).

La principale limitation dans l'utilisation de *Lactobacilles* pour la production de peptides bioactifs est leur faible capacité à libérer des peptides par fermentation en comparaison à l'utilisation d'enzymes purifiées (Daliri *et al.*, 2017; Hernández-Ledesma *et al.*, 2004). Ce problème a également été rencontré lors de l'utilisation de CEPs partiellement purifiées à cause du faible rendement d'extraction des enzymes à partir d'une culture bactérienne. L'utilisation de souches adaptées par ingénierie métabolique pourra répondre à ces problématiques sous réserve d'extraire les peptides du milieu de fermentation. Des modifications des voies métaboliques ont déjà été réalisées chez différentes souches de *Lactobacilles* pour plusieurs métabolismes tels que celui des exopolysaccharides, de l'acide lactique, des vitamines, du di-acétyle ou encore du sorbitol (Papagianni, 2012; Stefanovic *et al.*, 2017). A ce jour, aucune étude se concentrant sur la modification génétique du système protéolytique des *Lactobacilles* n'a été réalisée et de futurs travaux permettraient de déterminer si les capacités protéolytiques des souches peuvent être améliorées par surexpression des CEPs. Une telle transformation des souches pourrait en effet augmenter la libération de peptides bioactifs ou éventuellement diversifier le profil peptidique généré si des CEPs additionnelles sont co-exprimées dans la même souche.

En résumé, l'utilisation des *Lactobacilles* et/ou de leurs CEPs est une approche prometteuse pour la production de peptides bioactifs à partir de différentes sources protéiques. L'avantage du système bactérien est son faible coût en comparaison à l'utilisation d'enzymes purifiées. Certains défis doivent cependant être relevés dans ce but, comme la caractérisation approfondie des CEPs de différentes espèces ainsi que l'amélioration des quantités de peptides produits au cours de la fermentation. Des approches d'ingénieries métaboliques pourraient pallier à ces difficultés.

III. Le futur des Lactobacilles en tant que probiotiques

Depuis quelques années, avec le développement de nouvelles méthodologies de culture, du séquençage ainsi que des techniques d'édition de génome, la recherche sur les probiotiques a évolué. L'accumulation des connaissances sur le microbiote intestinal montre que de nombreux organismes le constituant peuvent exercer un potentiel rôle bénéfique sur la santé. Cela conduit au développement de probiotiques dits « sur mesure », également appelés probiotiques de nouvelle génération (NGPs) (O'Toole *et al.*, 2017).

En tant que membres du microbiote intestinal, les Lactobacilles sont toutes indiquées dans le développement de ces probiotiques particuliers. Le genre *Lactobacillus* représente en effet 6 % du nombre total de bactéries présentes dans le duodénum humain et 0,3 % dans le colon. Dans certaines pathologies, les proportions de Lactobacilles au sein du microbiote peuvent varier, ce qui suggère un rôle important de ces organismes sur la physiologie de l'hôte (Donaldson *et al.*, 2015; Heeney *et al.*, 2018). L'inconvénient, et à la fois l'intérêt des Lactobacilles, est leur forte diversité intra-spécifique retrouvée en termes d'effets probiotiques (Salvetti & O'Toole, 2017). Comme il a été observé au cours de ce projet, différentes souches ou espèces peuvent avoir plusieurs impacts sur la physiologie de l'hôte via des mécanismes d'actions variés. Cela rend l'étude des probiotiques, et en particulier de leurs actions, beaucoup plus complexe. La caractérisation des mécanismes d'action couplée à des analyses à grandes échelles permettra de comprendre ces phénomènes souches dépendants. Des études de génomique comparative ont été entreprises afin d'identifier des mécanismes d'actions communs aux Lactobacilles, comme la production de SCFAs, et des activités moins documentées tels que l'effet anti-cancéreux, retrouvés uniquement chez quelques souches (Salvetti & O'Toole, 2017; Sanders *et al.*, 2018). Les technologies d'édition de génome peuvent également être employées dans le but de comprendre les mécanismes mis en jeu par une souche bactérienne pour lui conférer l'activité biologique observée, ainsi que pour le développement de souches améliorées présentant par exemple, une tolérance à la DGI supérieure à la souche d'origine (Lebeer *et al.*, 2018; Mays & Nair, 2018).

L'utilisation des Lactobacilles en tant que probiotiques a fait l'objet de nombreuses recherches ayant permis de démontrer leurs applications dans le traitement ou la prévention de plusieurs pathologies et perturbations du métabolisme. Il existe cependant de nombreux mécanismes d'actions encore non caractérisés à ce jour, ce qui perturbe la compréhension des phénomènes induits par ces souches voire dans certains cas leur commercialisation. Des études *in vivo*, des

analyses génomiques et/ou métabolomiques à grandes échelles ainsi que le développement de nouveaux modèles *in vitro*, permettraient d'aboutir à une caractérisation précise des mécanismes d'action des probiotiques. Cette compréhension est nécessaire afin d'améliorer l'efficacité des thérapies et méthodes de prévention utilisant les probiotiques ainsi que leur acceptation par les autorités et le grand public.

Références bibliographiques

- Abraham, A.G., Antoni, G.L., Anon, M.C., 1993. Proteolytic activity of *Lactobacillus bulgaricus* grown in milk. *J. Dairy Sci.* 76, 1498–1505.
- Abuhashish, H.M., Ahmed, M.M., Sabry, D., Khattab, M.M., Al-Rejaie, S.S., 2017. ACE-2/Ang1-7/Mas cascade mediates ACE inhibitor, captopril, protective effects in estrogen-deficient osteoporotic rats. *Biomed. Pharmacother.* 92, 58–68.
- Abushelaibi, A., AlMahdin, S., El-Tarabily, K., Shah, N.P., Ayyash, M., 2017. Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. *LWT - Food Sci. Technol.* 79, 316–325.
- Aggarwal, J., Swami, G., Kumar, M., 2013. Probiotics and their effects on metabolic diseases: An update. *J. Clin. Diagnostic Res.* 7, 173–177.
- Aguilar-Toalá, J.E., Santiago-López, L., Peres, C.M., Peres, C., Garcia, H.S., Vallejo-Cordoba, B., González-Córdova, A.F., Hernández-Mendoza, A., 2017. Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains. *J. Dairy Sci.* 100, 65–75.
- Aggei, D., Danquah, M.K., 2012. Rethinking food-derived bioactive peptides for antimicrobial and immunomodulatory activities. *Trends Food Sci. Technol.* 23, 62–69.
- Aggei, D., He, L., 2015. Evaluation of cross-linked enzyme aggregates of *Lactobacillus* cell-envelope proteinases, for protein degradation. *Food Bioprod. Process.* 94, 59–69.
- Aggei, D., Ongkudon, C.M., Wei, C.Y., Chan, A.S., Danquah, M.K., 2016. Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides. *Food Bioprod. Process.* 98, 244–256.
- Aggei, D., Potumarthi, R., Danquah, M.K., 2012. Optimisation of batch culture conditions for cell-envelope-associated proteinase production from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 7830. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 168, 1035–1050.
- Ahtesh, F., Stojanovska, L., Shah, N., Mishra, V.K., 2016. Effect of Flavourzyme on angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides formed in skim milk and whey protein concentrate during fermentation by *Lactobacillus helveticus*. *J. Food Sci.* 81, 135–143.
- Alard, J., Lehrter, V., Rhimi, M., Mangin, I., Peucelle, V., Abraham, A., Mariadassou, M., Maguin, E., Waligora-Dupriet, A.-J., Pot, B., Wolowczuk, I., Grangette, C., 2015. Beneficial metabolic effects of selected probiotics on diet-induced obesity and insulin resistance in mice are associated with improvement of dysbiotic gut microbiota. *Environ. Microbiol.* 18, 1484–1497.
- Alard, J., Peucelle, V., Boutillier, D., Breton, J., Kuylle, S., Pot, B., Holowacz, S., Grangette, C., 2018. New probiotic strains for inflammatory bowel disease management identified by combining *in vitro* and *in vivo* approaches. *Benef. Microbes* 9, 317–331.
- Alcántara, C., Bäuerl, C., Revilla-Guarinos, A., Pérez-Martínez, G., Monedero, V., Zúñiga, M., 2016. Peptide and amino acid metabolism is controlled by an OmpR-family response regulator in *Lactobacillus casei*. *Mol. Microbiol.* 100, 25–41.
- Alhaj, O.A., Metwalli, A.A., Ismail, E.A., Ali, H.S., Al-Khalifa, A.S., Kanekanian, A.D., 2018. Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity and antimicrobial effect of fermented camel milk (*Camelus dromedarius*). *Int. J. Dairy Technol.* 71, 27–35.
- Amasheh, S., 2002. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J. Cell Sci.* 115, 4969–4976.
- Anderson, M.S., Gendrano, I.N., Liu, C., Jeffers, S., Mahon, C., Mehta, A., Mostoller, K., Zajic, S.,

- Morris, D., Lee, J., Stoch, S.A., 2014. Odanacatib, a selective cathepsin K inhibitor, demonstrates comparable pharmacodynamics and pharmacokinetics in older men and postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99, 552–560.
- Anderson, R.C., Cookson, A.L., McNabb, W.C., Park, Z., McCann, M.J., Kelly, W.J., Roy, N.C., 2010. *Lactobacillus plantarum* MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation. *BMC Microbiol.* 10, 316.
- Angelis, M. De, Calasso, M., Cavallo, N., Cagno, R. Di, Gobbetti, M., Science, F., Moro, A., Science, F., Via, G., Man, D., 2016. Functional proteomics within the genus *Lactobacillus*. *Proteomics.* 16, 946–962.
- Angmo, K., Kumari, A., Savitri, Bhalla, T.C., 2016. Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT - Food Sci. Technol.* 66, 428–435.
- Anukam, K., Reid, G., 2007. Probiotics : 100 years (1907-2007) after Elie Metchnikoff's Observation. *Commun. Curr. Res. Educ. Top. trends Appl. Microbiol.* 466–474.
- Areco, V., Rivoira, M.A., Rodriguez, V., Marchionatti, A.M., Carpentieri, A., Tolosa de Talamoni, N., 2015. Dietary and pharmacological compounds altering intestinal calcium absorption in humans and animals. *Nutr. Res. Rev.* 28, 83–99.
- Avonts, L., Uytven, E. Van, Vuyst, L. De, 2004. Cell growth and bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus* strains in different media. *Int. Dairy J.* 14, 947–955.
- Ayyash, M., Al-Nuaimi, A.K., Al-Mahadin, S., Liu, S.Q., 2017. *In vitro* investigation of anticancer and ACE-inhibiting activity, α -amylase and α -glucosidase inhibition, and antioxidant activity of camel milk fermented with camel milk probiotic: A comparative study with fermented bovine milk. *Food Chem.* 239, 588–597.
- Ayyash, M.M., Sherkat, F., Shah, N.P., 2012. The impact of NaCl substitution with KCl on proteinase activities cell-free extract and cell-free supernatant at different pH levels and salt concentrations: *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *J. Food Sci.* 77, 490–498.
- Badel, S., Bernardi, T., Michaud, P., 2011. New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides. *Biotechnol. Adv.* 29, 54–66.
- Baick, S.-C., Kim, C.-H., 2015. Assessment of characteristics and functional properties of *Lactobacillus* species isolated from Kimchi for dairy use. *Korean J. food Sci. Anim. Resour.* 35, 339–49.
- Bakr Shori, A., Salihin Baba, A., 2015. Fermented milk derives bioactive peptides with antihypertensive effects. *Integr. Food, Nutr. Metab.* 2, 180–183.
- Barbáchano, A., Fernández-Barral, A., Ferrer-Mayorga, G., Costales-Carrera, A., Larriba, M.J., Muñoz, A., 2017. The endocrine vitamin D system in the gut. *Mol. Cell. Endocrinol.* 453, 79–87.
- Barchetta, I., Cimini, F.A., Bloise, D., Cavallo, M.G., 2016. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and bone metabolism: is vitamin D the link? *Acta Diabetol.*
- Belguesmia, Y., Domenger, D., Caron, J., Dhulster, P., Ravallec, R., Drider, D., Cudennec, B., 2016. Novel probiotic evidence of *Lactobacilli* on immunomodulation and regulation of satiety hormones release in intestinal cells. *J. Funct. Foods* 24, 276–286.
- Bellon-Fontaine, M.N., Rault, J., Van Oss, C.J., 1996. Microbial adhesion to solvents: A novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 7, 47–53.
- Bendali, F., Kerdouche, K., Hamma-Faradji, S., Drider, D., 2017. *In vitro* and *in vivo* cholesterol lowering ability of *Lactobacillus pentosus* KF923750. *Benef. Microbes* 8, 271–280.

- Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Munoz-Quezada, S., Gomez-Llorente, C., Gil, A., 2012. Probiotic mechanisms of action. *Ann. Nutr. Metab.* 61, 160–174.
- Beto, J.A., 2015. The role of calcium in human aging. *Clin. Nutr. Res.* 4, 1-8.
- Bezerra, T.K.A., De Araujo, A.R.R., Do Nascimento, E.S., De Matos Paz, J.E., Gadelha, C.A., Gadelha, T.S., Pacheco, M.T.B., Do Egypto Queiroga, R.D.C.R., De Oliveira, M.E.G., Madruga, M.S., 2016. Proteolysis in goat “coalho” cheese supplemented with probiotic lactic acid bacteria. *Food Chem.* 196, 359–366.
- Bimbo, F., Bonanno, A., Nocella, G., Viscecchia, R., Nardone, G., Devitiis, B. De, Carlucci, D., 2017. Consumers’ acceptance and preferences for nutrition-modified and functional dairy products : A systematic review. *Appetite* 113, 141–154.
- Biver, E., 2018. Fermented dairy products consumption is associated with attenuated cortical bone loss independently of total calcium , protein , and energy intakes in healthy postmenopausal women. *Osteoporos Int.*
- Bonomini, F., Rodella, L.F., Rezzani, R., 2015. Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress. *Aging Dis.* 6, 109-120.
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J.C., Gerds, M.L., Hammes, W.P., Harnett, J., Huys, G., Laulund, S., Ouwehand, A., Powell, I.B., Prajapati, J.B., Seto, Y., Ter Schure, E., Van Boven, A., Vankerckhoven, V., Zgoda, A., Tuijelaars, S., Hansen, E.B., 2012. Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *Int. J. Food Microbiol.* 154, 87–97.
- Boyaval, P., Terre, S., Corre, C., 1988. Production d’acide lactique à partir de perméat de lactosérum par fermentation continue en réacteur à membrane. *Le Lait INRA Editions.* 68, 65-84.
- Braconi, D., Bernardini, G., Millucci, L., Santucci, A., 2017. Foodomics for human health: current status and perspectives. *Expert Rev. Proteomics* 15, 153–164.
- Brincat, M., Gambin, J., Brincat, M., Calleja-Agius, J., 2015. The role of vitamin D in osteoporosis. *Maturitas* 80, 329–332.
- Broadbent, J.R., Cai, H., Larsen, R.L., Hughes, J.E., Welker, D.L., De Carvalho, V.G., Tompkins, T. a, Ardö, Y., Vogensen, F., De Lorentiis, a, Gatti, M., Neviani, E., Steele, J.L., 2011. Genetic diversity in proteolytic enzymes and amino acid metabolism among *Lactobacillus helveticus* strains. *J. Dairy Sci.* 94, 4313–4328.
- Bronner, F., 2003. Mechanisms of intestinal calcium absorption. *J. Cell. Biochem.* 88, 387–393.
- Brouwer, C.P.J.M., Rahman, M., Welling, M.M., 2011. Discovery and development of a synthetic peptide derived from lactoferrin for clinical use. *Peptides* 32, 1953–1963.
- Brown, L., Villegas, J.M., Elean, M., Fadda, S., Mozzi, F., Saavedra, L., Hebert, E.M., 2017. YebC, a putative transcriptional factor involved in the regulation of the proteolytic system of *Lactobacillus*. *Sci. Rep.* 7, 1–11.
- Burgain, J., Scher, J., Francius, G., Borges, F., Corgneau, M., Revol-Junelles, A.M., Cailliez-Grimal, C., Gaiani, C., 2014. Lactic acid bacteria in dairy food: Surface characterization and interactions with food matrix components. *Adv. Colloid Interface Sci.* 213, 21–35.
- Capozzi, V., Russo, P., Dueñas, M.T., López, P., Spano, G., 2012. Lactic acid bacteria producing B-group vitamins: A great potential for functional cereals products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 1383–1394.
- Capriotti, A.L., Cavaliere, C., Piovesana, S., Samperi, R., Laganà, A., 2016. Recent trends in the analysis of bioactive peptides in milk and dairy products. *Anal Bioanal Chem.* 408, 2677–2685.

- Carmeliet, G., Dermauw, V., Bouillon, R., 2015. Vitamin D signaling in calcium and bone homeostasis: A delicate balance. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 29, 621–631.
- Caron, J., Cudennec, B., Domenger, D., Belguesmia, Y., Flahaut, C., Kouach, M., Lesage, J., Goossens, J.F., Dhulster, P., Ravallec, R., 2016. Simulated GI digestion of dietary protein: Release of new bioactive peptides involved in gut hormone secretion. *Food Res. Int.* 89, 382–390.
- Caron, J., Domenger, D., Belguesmia, Y., Kouach, M., Lesage, J., Goossens, J.-F., Dhulster, P., Ravallec, R., Cudennec, B., 2015. Protein digestion and energy homeostasis: How generated peptides may impact intestinal hormones? *Food Res. Int.* 1–9.
- Caron, J., Domenger, D., Dhulster, P., Ravallec, R., Cudennec, B., 2017. Protein digestion-derived peptides and the peripheral regulation of food intake. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*.
- Carrasco-Castilla, J., Hernández-Álvarez, A.J., Jiménez-Martínez, C., Gutiérrez-López, G.F., Dávila-Ortiz, G., 2012. Use of proteomics and peptidomics methods in food bioactive peptide science and engineering. *Food Eng. Rev.* 4, 224–243.
- Carvalho, B.M., Abdalla Saad, M.J., 2013. Influence of gut microbiota on subclinical inflammation and insulin resistance. *Mediators Inflamm.* 2013.
- Cashman, K.D., 2002. Calcium intake, calcium bioavailability and bone health. *Br. J. Nutr.* 87 Suppl 2, 169–177.
- Charteris, Kelly, Morelli, Collins, 1998. Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.* 84, 759–768.
- Chen, J.-P., Chen, G.-C., Wang, X.-P., Qin, L., Bai, Y., 2018a. Dietary fiber and metabolic syndrome: A meta-analysis and review of related mechanisms. *Nutrients* 10, 24.
- Chen, X., Wang, Z., Duan, N., Zhu, G., Schwarz, E. M., Xie, C., 2018b. Osteoblast-osteoclast interactions. *Connect. Tissue Res.* 59, 99–107.
- Chen, X.F., Li, X.L., Liu, J.X., Xu, J., Zhao, Y.Y., Yang, M., Zhang, Y., 2018c. Inhibition on angiotensin-converting enzyme exerts beneficial effects on trabecular bone in orchidectomized mice. *Pharmacol. Reports* 70, 705–711.
- Chen, Y., Liu, W., Xue, J., Yang, J., Chen, X., Shao, Y., Kwok, L., Bilige, M., Mang, L., Zhang, H., 2014. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of *Lactobacillus helveticus* strains from traditional fermented dairy foods and antihypertensive effect of fermented milk of strain H9. *J. Dairy Sci.* 97, 6680–6692.
- Cheng, M.C., Pan, T.M., 2017. Prevention of hypertension-induced vascular dementia by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101-fermented products. *Pharm. Biol.* 55, 487–496.
- Choudhury, B., Swaminathan, T., 2006. Lactic acid fermentation in cell-recycle membrane bioreactor. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 128, 171–183.
- Cifuentes, A., 2009. Food analysis and foodomics. *J. Chromatogr. A.* 1216, 7109.
- Claesson, M.J., Van Sinderen, D., O'Toole, P.W., 2007. The genus *Lactobacillus* - A genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiol. Lett.* 269, 22–28.
- Claustre, J., Toumi, F., Trompette, A., Jourdan, G., Guignard, H., Chayvialle, J.A., Plaisancié, P., 2002. Effects of peptides derived from dietary proteins on mucus secretion in rat jejunum. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 283, 521–528.
- Colombini, A., Perego, S., Ardoino, I., Marasco, E., Lombardi, G., Fiorilli, A., Biganzoli, E., Tettamanti, G., Ferraretto, A., 2013. Evaluation of a possible direct effect by casein phosphopeptides on paracellular and vitamin D controlled transcellular calcium transport mechanisms in intestinal

- human HT-29 and Caco2 cell lines. *Food Funct.* 4, 1195–203.
- Cornier, M.A., Dabelea, D., Hernandez, T.L., Lindstrom, R.C., Steig, A.J., Stob, N.R., Van Pelt, R.E., Wang, H., Eckel, R.H., 2008. The metabolic syndrome. *Endocr. Rev.* 29, 777–822.
- Cosentino, S., Donida, B.M., Marasco, E., Del Favero, E., Cantù, L., Lombardi, G., Colombini, A., Iametti, S., Valaperta, S., Fiorilli, A., Tettamanti, G., Ferraretto, A., 2010a. Calcium ions enclosed in casein phosphopeptide aggregates are directly involved in the mineral uptake by differentiated HT-29 cells. *Int. Dairy J.* 20, 770–776.
- Cosentino, S., Gravaghi, C., Donetti, E., Donida, B.M., Lombardi, G., Bedoni, M., Fiorilli, A., Tettamanti, G., Ferraretto, A., 2010b. Caseinphosphopeptide-induced calcium uptake in human intestinal cell lines HT-29 and Caco-2 is correlated to cellular differentiation. *J. Nutr. Biochem.* 21, 247–254.
- Cosman, F., de Beur, S.J., LeBoff, M.S., Lewiecki, E.M., Tanner, B., Randall, S., Lindsay, R., 2014. Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. *Osteoporos. Int.* 25, 2359–2381.
- Courtin, P., Monnet, V., Rul, F., 2002. Cell-wall proteinases PrtS and PrtB have a different role in *Streptococcus thermophilus*/*Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures in milk. *Microbiology* 148, 3413–3421.
- Coutte, F., Lecouturier, D., Firdaous, L., Kapel, R., Bazinet, L., Cabassud, C., Dhulster, P., 2017. Recent trends in membrane bioreactors, in: Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Elsevier, pp. 279–311.
- Cross, K.J., Huq, N.L., Palamara, J.E., Perich, J.W., Reynolds, E.C., 2005. Physicochemical characterisation of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate nanocomplexes. *J. Biol. Chem.* 280, 15362–15369.
- Cummings, S.R., Martin, J.S., McClung, M.R., Siris, E.S., Eastell, R., Reid, I.R., Delmas, P., Zoog, H.B., Austin, M., Wang, A., Kutilek, S., Adami, S., Zanchetta, J., Libanati, C., Siddhanti, S., Christiansen, C., 2009. Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* 361, 756–765.
- D'Amelio, P., Sassi, F., 2018. Gut microbiota, immune system, and bone. *Calcif. Tissue Int.* 102, 415–425.
- Daliri, E., Oh, D., Lee, B., 2017. Bioactive peptides. *Foods* 6, 32.
- Dallas, D.C., Citerne, F., Tian, T., Silva, V.L.M., Kalanetra, K.M., Frese, S.A., Robinson, R.C., Mills, D.A., Barile, D., 2016. Peptidomic analysis reveals proteolytic activity of kefir microorganisms on bovine milk proteins. *Food Chem.* 197, 273–284.
- Dallas, D.C., Guerrero, A., Parker, E.A., Robinson, R.C., Gan, J., German, J.B., Barile, D., Lebrilla, C.B., 2015. Current peptidomics: applications, purification, identification, quantification, and functional analysis. *Proteomics* 15, 1026–1038.
- De Angelis, M., Gobbetti, M., 2004. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: A review. *Proteomics* 4, 106–122.
- De Man, J.C., Rogosa, M., Sharpe, M.E., 1960. A medium used for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriol.* 23, 130–135.
- Del Piano, M., Morelli, L., Strozzi, G.P., Allesina, S., Barba, M., Deidda, F., Lorenzini, P., Ballaré, M., Montino, F., Orsello, M., Sartori, M., Garelo, E., Carmagnola, S., Pagliarulo, M., Capurso, L., 2006. Probiotics: from research to consumer. *Dig. Liver Dis.* 38, 248–255.
- Derrien, M., Van Hylckama Vlieg, J.E.T., 2015. Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. *Trends Microbiol.* 23, 354–366.

- Dhanwal, D.K., Dennison, E.M., Harvey, N.C., Cooper, C., 2011. Epidemiology of hip fracture: Worldwide geographic variation. *Indian J. Orthop.* 45, 15–22.
- Di Cerbo, A., Palmieri, B., Aponte, M., Morales-Medina, J.C., Iannitti, T., 2016. Mechanisms and therapeutic effectiveness of lactobacilli. *J. Clin. Pathol.* 69, 187–203.
- Diao, T.Y., Pan, H., Gu, S.S., Chen, X., Zhang, F.Y., Wong, M.S., Zhang, Y., 2014. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor, captopril, on bone of mice with streptozotocin-induced type 1 diabetes. *J. Bone Miner. Metab.* 32, 261–270.
- Dimitrov, Z., Gotova, I., Chorbadjiyska, E., 2014. *In vitro* characterization of the adhesive factors of selected probiotics to Caco-2 epithelium cell line. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 28, 1079–1083.
- Domenger, D., Cudennec, B., Kouach, M., Touche, V., Landry, C., Lesage, J., Gosselet, F., Lestavel, S., Goossens, J.-F., Dhulster, P., Ravallec, R., 2018. Food-derived hemorphins cross intestinal and blood-brain barriers *in vitro*. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 9, 159.
- Donaldson, G.P., Lee, S.M., Mazmanian, S.K., 2015. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 20–32.
- Donida, B.M., Mrak, E., Gravaghi, C., Villa, I., Cosentino, S., Zacchi, E., Perego, S., Rubinacci, A., Fiorilli, A., Tettamanti, G., Ferraretto, A., 2009. Casein phosphopeptides promote calcium uptake and modulate the differentiation pathway in human primary osteoblast-like cells. *Peptides* 30, 2233–2241.
- Drevet, P., 2017. Preuves de l'effet antihypertenseur d'un hydrolysate de coproduit d'escargot terrestre (*Helix aspersa*) – Identification des peptides impliqués. *Ann. Cardiol. Angeiol. (Paris)*. 66, 140–148.
- Drider, D., Rebuffat, S., 2011. Prokaryotic antimicrobial peptides. Springer New York, NY.
- Dudarić, L., Fužinac-Smojver, A., Muhvić, D., Giacometti, J., 2015. The role of polyphenols on bone metabolism in osteoporosis. *Food Res. Int.* 77, 290–298.
- Dumas, B.R., Brignon, G., Grosclaude, F., Mercier, J.-C., 1972. Structure primaire de la caseine bovine: Sequence complete. *Eur. J. Biochem.* 25, 505–514.
- Dupont, D., 2017. Peptidomic as a tool for assessing protein digestion. *Curr. Opin. Food Sci.* 16, 53–58.
- Dziuba, B., Dziuba, M., 2014. Milk proteins-derived bioactive peptides in dairy products: Molecular, biological and methodological aspects. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 13, 5–25.
- EFSA, 2009. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to isoleucine-proline-proline (IPP) and valine-proline-proline (VPP) and maintenance of normal blood pressure (ID 615 ,661,1831,1832,2891), and maintenance of the elastic prope. *EFSA J.* 7, 1–18.
- EFSA, 2011. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to live yoghurt cultures and improved lactose digestion (ID 1143,2976) pursuant to Article 13 (1) of Regulation (EC) No 1924 / 2006. *EFSA J.* 8, 1–18.
- Ehrlich, S.D., 2016. The human gut microbiome impacts health and disease. *Comptes Rendus - Biol.* 339, 319–323.
- El-Ghaish, S., Rabesona, H., Choiset, Y., Sitohy, M., Haertlé, T., Chobert, J.-M., 2011. Proteolysis by *Lactobacillus fermentum* IFO3956 isolated from Egyptian milk products decreases immuno-reactivity of α S1-casein. *J. Dairy Res.* 78, 203–210.
- Elfahri, K.R., Donkor, O.N., Vasiljevic, T., 2014. Potential of novel *Lactobacillus helveticus* strains and their cell wall bound proteases to release physiologically active peptides from milk proteins. *Int. Dairy J.* 38, 37–46.

- Epstein, S., Defeudis, G., Manfrini, S., Napoli, N., Pozzilli, P., 2016. Diabetes and disordered bone metabolism (diabetic osteodystrophy): time for recognition. *Osteoporos. Int.* 27, 1931–1951.
- Er, S., Koparal, A.T., Kivanç, M., 2015. Cytotoxic effects of various lactic acid bacteria on Caco-2 cells. *Turkish J. Biol.* 39, 23–30.
- Erba, D., Ciappellano, S., Testolin, G., 2001. Effect of caseinphosphopeptides on inhibition of calcium intestinal absorption due to phosphate. *Nutr. Res.* 21, 649–656.
- Fändriks, L., 2011. The renin-angiotensin system and the gastrointestinal mucosa. *Acta Physiol.* 201, 157–167.
- FAO/WHO, 2011. Codex Standard for Milk and Milk Products., *CODEX Alimentarius*.
- FAO/WHO, 2003. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. *World Health Organ. Tech.*
- FAO/WHO, 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. 1–21.
- FAO/WHO, 2001. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria 1–43.
- Fardet, A., Rock, E., 2017. In vitro and in vivo antioxidant potential of milks, yoghurts, fermented milks and cheeses: a narrative review of evidence. *Nutr. Res. Rev.* 1–19.
- Farhat, G.N., Cauley, J.A., 2008. The link between osteoporosis and cardiovascular disease. *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* 5, 19–34.
- Felis, G.E., Dellaglio, F., 2007. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 8, 44–61.
- Feng, Y., Zhou, M., Zhang, Q., Liu, H., Xu, Y., Shu, L., Zhang, J., Miao, D., Ren, Y., 2015. Synergistic effects of high dietary calcium and exogenous parathyroid hormone in promoting osteoblastic bone formation in mice. *Br. J. Nutr.* 113, 909–922.
- Fernandez, E.M., Valenti, V., Rockel, C., Hermann, C., Pot, B., Boneca, I.G., Grangette, C., 2011. Anti-inflammatory capacity of selected lactobacilli in experimental colitis is driven by NOD2-mediated recognition of a specific peptidoglycan-derived muropeptide. *Gut* 60, 1050–9.
- Fernandez, M.A., Panahi, S., Daniel, N., Tremblay, A., Marette, A., 2017. Yogurt and cardiometabolic diseases: A critical review of potential mechanisms. *Adv. Nutr. An Int. Rev. J.* 8, 812–829.
- Fernandez, M.F., Boris, S., Barbés, C., 2003. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.* 94, 449–455.
- Ferraretto, A., Signorile, A., Gravaghi, C., Fiorilli, A., Tettamanti, G., 2001. Casein phosphopeptides influence calcium uptake by cultured human intestinal HT-29 tumor cells. *J. Nutr.* 131, 1655–61.
- Fira, D., Kojic, M., Banina, A., Spasojevic, I., Strahinic, I., Topisirovic, L., 2001. Characterization of cell envelope-associated proteinases of thermophilic lactobacilli. *J. Appl. Microbiol.* 90, 123–130.
- Fitzgerald, C., Aluko, R.E., Hossain, M., Rai, D.K., Hayes, M., 2014. Potential of a renin inhibitory peptide from the red seaweed *Palmaria palmata* as a functional food ingredient following confirmation and characterization of a hypotensive effect in spontaneously hypertensive rats. *J. Agric. Food Chem.* 62, 8352–8356.
- Fleet, J., Schoch, R., 2010. Molecular mechanisms for regulation of intestinal calcium absorption by vitamin D and other factors. *Crit Rev Clin Lab Sci* 47, 181–195.
- Fleet, J.C., 2017. The role of vitamin D in the endocrinology controlling calcium homeostasis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 453, 36–45.
- Fleet, J.C., Wood, R.J., 1999. Specific 1,25(OH)2D3-mediated regulation of transcellular calcium

- transport in Caco-2 cells. *Am J Physiol* 276, 958-964.
- Flint, H.J., Scott, K.P., Louis, P., Duncan, S.H., 2012. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 577–589.
- Fogh, J., Trempe, G., 1975. New Human Tumor Cell Lines, in: *Human Tumor Cells in Vitro*. pp. 115–159.
- Fogh, J., Wright, W.C., Loveless, J.D., 1977. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 58, 209–214.
- Fox, J., 2005. The R Commander: A basic-statistics graphical user interface to R. *J. Stat. Softw.* 14, 1–42.
- Fujita, H., Sugimoto, K., Inatomi, S., Maeda, T., Osanai, M., Uchiyama, Y., Yamamoto, Y., Wada, T., Kojima, T., Yokozaki, H., Yamashita, T., Kato, S., Sawada, N., Chiba, H., 2008. Tight junction proteins claudin-2 and -12 are critical for vitamin D-dependent Ca²⁺ absorption between enterocytes. *Mol. Biol. Cell* 19, 1912–1921.
- Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animals, *Journal of Applied Bacteriology*. 66, 365-378.
- Furuno, T., Nakanishi, M., 2012. Kefiran suppresses antigen-induced mast cell activation. *Biol. Pharm. Bull.* 35, 178–83.
- Gandhi, A., Shah, N.P., 2014. Cell growth and proteolytic activity of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, and *Streptococcus thermophilus* in milk as affected by supplementation with peptide fractions. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 65, 937–941.
- García-Cayuela, T., Korany, A.M., Bustos, I., P. Gómez de Cadiñanos, L., Requena, T., Peláez, C., Martínez-Cuesta, M.C., 2014. Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. *Food Res. Int.* 57, 44–50.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A., 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *Proteomics Protoc. Handb.* 571–607.
- Genay, M., Sadat, L., Gagnaire, V., Lortal, S., 2009. PrtH2, not prtH, is the ubiquitous cell wall proteinase gene in *Lactobacillus helveticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 3238–3249.
- Georgalaki, M., Zoumpopoulou, G., Mavrogonatou, E., Van Driessche, G., Alexandraki, V., Anastasiou, R., Papadelli, M., Kazou, M., Manolopoulou, E., Kletsas, D., Devreese, B., Papadimitriou, K., Tsakalidou, E., 2017. Evaluation of the antihypertensive angiotensin-converting enzyme inhibitory (ACE-I) activity and other probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditional Greek dairy products. *Int. Dairy J.* 75, 10–21.
- Giacometti, J., Buretić-Tomljanović, A., 2017. Peptidomics as a tool for characterizing bioactive milk peptides. *Food Chem.* 230, 91–98.
- Gilman, J., Cashman, K.D., 2002. The effect of probiotic bacteria on transepithelial calcium transport and calcium uptake in human intestinal-like caco-2 cells. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 7, 1–6.
- Giuliano, A.R., Franceschi, R.T., Wood, R.J., 1991. Characterization of the vitamin D receptor from the Caco-2 human colon carcinoma cell line: effect of cellular differentiation. *Arch. Biochem. Biophys.* 285, 261–9.
- Gnasegaran, G.K., Agyei, D., Pan, S., Sarethy, I.P., Acquah, C., Danquah, M.K., 2017. Process development for bioactive peptide production, in: *Food Bioactives: Extraction and Biotechnology Applications*. pp. 91–110.
- Godinho, R., Mega, C., Teixeira-de-Lemos, E., Carvalho, E., Teixeira, F., Fernandes, R., Reis, F., 2015.

- The place of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes therapeutics: A “me too” or “the special one” antidiabetic class ? *J. Diabetes Res.* 2015, 806979.
- Granato, D., Branco, G.F., Cruz, A.G., Faria, J. de A.F., Shah, N.P., 2010. Probiotic dairy products as functional foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 9, 455–470.
- Grangette, C., Nutten, S., Palumbo, E., Morath, S., Hermann, C., Dewulf, J., Pot, B., Hartung, T., Hols, P., Mercenier, A., 2005. Enhanced antiinflammatory capacity of a *Lactobacillus plantarum* mutant synthesizing modified teichoic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 10321–6.
- Gravaghi, C., Del Favero, E., Cantu', L., Donetti, E., Bedoni, M., Fiorilli, A., Tettamanti, G., Ferraretto, A., 2007. Casein phosphopeptide promotion of calcium uptake in HT-29 cells - Relationship between biological activity and supramolecular structure. *FEBS J.* 274, 4999–5011.
- Griffiths, M.W., Tellez, a. M., 2013. *Lactobacillus helveticus*: The proteolytic system. *Front. Microbiol.* 4, 1–9.
- Guantario, B., Zinno, P., Schifano, E., Roselli, M., Perozzi, G., Palleschi, C., Uccelletti, D., Devirgiliis, C., 2018. *In vitro* and *in vivo* selection of potentially probiotic lactobacilli from nocellara del belice table olives. *Front. Microbiol.* 9, 595.
- Gupta, S., Kapoor, P., Chaudhary, K., Gautam, A., Kumar, R., Raghava, G.P.S., 2013. *In silico* approach for predicting toxicity of peptides and proteins. *PLoS One* 8.
- Hafeez, Z., Cakir-Kiefer, C., Roux, E., Perrin, C., Miclo, L., Dary-Mourot, A., 2014. Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to functionalize fermented milk products. *Food Res. Int.* 63, 71-80.
- Han, Z., Luo, X., Tian, H., Men, Y., Wang, N., Jiang, Y., Zhang, T., 2012. Separation of angiotensin-converting enzyme inhibitors from fermented milk prepared with *Lactobacillus casei* HZ1, in: *Smart Materials and Nanotechnology in Engineering*. pp. 161–167.
- Harvey, N., Dennison, E., Cooper, C., 2014. Osteoporosis: A lifecourse approach. *J. Bone Miner. Res.* 29, 1917–1925.
- Hassan-Smith, Z., Gittoes, N., 2017. Hypocalcaemia. *Med. (United Kingdom)* 45, 555–559.
- Haussler, M.R., Haussler, C.A., Whitfield, G.K., Hsieh, J.C., Thompson, P.D., Barthel, T.K., Bartik, L., Egan, J.B., Wu, Y., Kubicek, J.L., Lowmiller, C.L., Moffet, E.W., Forster, R.E., Jurutka, P.W., 2010. The nuclear vitamin D receptor controls the expression of genes encoding factors which feed the “Fountain of Youth” to mediate healthful aging. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 121, 88–97.
- Hayes, M., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Hill, C., Stanton, C., 2006. Casein-derived antimicrobial peptides generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2260–2264.
- Hebert, E.M., Mamone, G., Picariello, G., Raya, R.R., Savoy, G., Ferranti, P., Addeo, F., 2008. Characterization of the pattern of α s1- and β -casein breakdown and release of a bioactive peptide by a cell envelope proteinase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3682–3689.
- Hebert, E.M., Raya, R.R., De Giori, G.S., 2000. Nutritional requirements and nitrogen-dependent regulation of proteinase activity of *Lactobacillus helveticus* CRL 1062. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5316–5321.
- Hébert, E.M., Raya, R.R., Savoy de Giori, G., 2002. Modulation of the cell-surface proteinase activity of thermophilic lactobacilli by the peptide supply. *Curr. Microbiol.* 45, 385–389.
- Heeney, D.D., Gareau, M.G., Marco, M.L., 2018. Intestinal *Lactobacillus* in health and disease, a driver or just along for the ride? *Curr. Opin. Biotechnol.* 49, 140–147.

- Hellberg, S., Sjöström, M., Skagerberg, B., Wold, S., 1987. Peptide quantitative structure-activity relationships, a multivariate approach. *J. Med. Chem.* 30, 1126–1135.
- Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M., Recio, I., 2004. Application of high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the identification of biologically active peptides produced by milk fermentation and simulated gastrointestinal digestion, *Journal of Chromatography A*. 107–114.
- Hernández-Ledesma, B., García-Nebot, M.J., Fernández-Tomé, S., Amigo, L., Recio, I., 2014. Dairy protein hydrolysates: Peptides for health benefits. *Int. Dairy J.* 38, 82–100.
- Hernlund, E., Svedbom, A., Ivergård, M., Compston, J., et al, 2013. Osteoporosis in the EU : medical management , epidemiology and economic burden. Key findings of the IOF / EFPIA EU 27 report. *Arch. Osteoporos.* 8:136.
- Hill, C., Ellen Sanders, M., 2013. Rethinking “probiotics.” *Gut Microbes* 4, 269–270.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E., 2014. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 506–514.
- Hirano, J., Yoshida, T., Sugiyama, T., Koide, N., Mori, I., 2003. The effect of *Lactobacillus rhamnosus* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection of human intestinal cells *in vitro*. *Microbiol. Immunol.* 47, 405–409.
- Hoffman, D.E., Fraser, C.M., Palumbo, F., Ravel, J., Rowthorn, V., Schwartz, J., 2012. Federal Regulation of Probiotics: An Analysis of the Existing Regulatory Framework and Recommendations for Alternative Frameworks 115.
- Hou, J.-C., Liu, F., Ren, D.-X., Han, W.-W., Du, Y.-O., 2015. Effect of culturing conditions on the expression of key enzymes in the proteolytic system of *Lactobacillus bulgaricus*. *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed Biotechnol)* 16, 317–326.
- Hove, K.D., Brons, C., Faerch, K., Lund, S.S., Rossing, P., Vaag, A., 2015. Effects of 12 weeks of treatment with fermented milk on blood pressure, glucose metabolism and markers of cardiovascular risk in patients with type 2 diabetes: A randomised double-blind placebo-controlled study. *Eur. J. Endocrinol.* 172, 11–20.
- Howell, S., Brewis, I.A., Hooper, N.M., Kenny, A.J., Turner, A.J., 1993. Mosaic expression of membrane peptidases by confluent cultures of Caco-2 cells. *FEBS Lett.* 317, 109–112.
- Hsieh, C.-Y., Osaka, T., Moriyama, E., Date, Y., Kikuchi, J., Tsuneda, S., 2015. Strengthening of the intestinal epithelial tight junction by *Bifidobacterium bifidum*. *Physiol. Rep.* 3, e12327–e12327.
- Ikram-ul-Haq, Mukhtar, H., 2006. Biosynthesis of protease from *Lactobacillus paracasei*: Kinetic analysis of fermentation parameters. *Indian J. Biochem. Biophys.* 43, 377–381.
- Inabu, Y., Saegusa, A., Inouchi, K., Koike, S., Oba, M., Sugino, T., 2017. Plasma concentrations of glucagon-like peptide 1 and 2 in calves fed calf starters containing lactose. *J. Dairy Sci.* 100, 9361–9371.
- Iwaniak, A., Minkiewicz, P., Darewicz, M., Protasiewicz, M., Mogut, D., 2015. Chemometrics and cheminformatics in the analysis of biologically active peptides from food sources. *J. Funct. Foods* 16, 334–351.
- Jackson, R.D., LaCroix, A.Z., Gass, M., Wallace, R.B., Robbins, J., Lewis, C.E., Bassford, T., Beresford, S.A.A., Black, H.R., Blanchette, P., Bonds, D.E., Brunner, R.L., Brzyski, R.G., Caan, B., Cauley, J.A., Chlebowski, R.T., Cummings, S.R., Granek, I., Hays, J., Heiss, G., Hendrix, S.L., Howard, B. V., Hsia, J., Hubbell, F.A., Johnson, K.C., Judd, H., Kotchen, J.M., Kuller, L.H.,

- Langer, R.D., Lasser, N.L., Limacher, M.C., Ludlam, S., Manson, J.E., Margolis, K.L., McGowan, J., Ockene, J.K., O'Sullivan, M.J., Phillips, L., Prentice, R.L., Sarto, G.E., Stefanick, M.L., Van Horn, L., Wactawski-Wende, J., Whitlock, E., Anderson, G.L., Assaf, A.R., Barad, D., 2006. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of fractures. *N. Engl. J. Med.* 354, 669–683.
- Jahangiri, R., Soltani, S., Barzegar, A., 2014. A review of QSAR studies to predict activity of ACE peptide inhibitors. *Pharm. Sci.* 20, 122–129.
- Jakubczyk, A., Karaś, M., Baraniak, B., Pietrzak, M., 2013. The impact of fermentation and in vitro digestion on formation angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from pea proteins. *Food Chem.* 141, 3774–3780.
- Jauhiainen, T., Korpela, R., 2007. Milk peptides and blood pressure. *J. Nutr.* 137, 825S–829.
- Jensen, M.P., Vogensen, F.K., Ardö, Y., 2009. Variation in aminopeptidase and aminotransferase activities of six cheese related *Lactobacillus helveticus* strains. *Int. Dairy J.* 19, 661–668.
- Jeong, D., Kim, D., Kang, I., Kim, H., Song, K., Kim, H., Seo, K., 2017. Characterization and antibacterial activity of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* DN1 isolated from kefir. *Food Control* 78, 436–442.
- Jin, Y., Yu, Y., Qi, Y., Wang, F., Yan, J., Zou, H., 2016. Peptide profiling and the bioactivity character of yogurt in the simulated gastrointestinal digestion. *J. Proteomics* 141, 24–46.
- Jose, N.M., Bunt, C.R., McDowell, A., Chiu, J.Z.S., Hussain, M.A., 2017. Short communication: A study of *Lactobacillus* isolates' adherence to and influence on membrane integrity of human Caco-2 cells. *J. Dairy Sci.* 100, 7891–7896.
- Juarez del Valle, M., Laiño, J.E., Savoy de Giori, G., LeBlanc, J.G., 2017. Factors stimulating riboflavin produced by *Lactobacillus plantarum* CRL 725 grown in a semi-defined medium. *J. Basic Microbiol.* 57, 245–252.
- Jung, I., Lovitt, R.W., 2010. A comparative study of the growth of lactic acid bacteria in a pilot scale membrane bioreactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85, 1250–1259.
- Kamau, S.M., Lu, R., Chen, W., Chen, W.E.I., Liu, X., Tian, F., 2010. Functional Significance of Bioactive Peptides Derived from Milk Proteins. *Food Reviews International.* 26, 386–401.
- Kassi, E., Pervanidou, P., Kaltsas, G., Chrousos, G., 2011. Metabolic syndrome: Definitions and controversies. *BMC Med.* 9, 48.
- Kaur, M., Singh, H., Jangra, M., Kaur, L., Jaswal, P., Dureja, C., Nandanwar, H., Chaudhuri, S.R., Raje, M., Mishra, S., Pinnaka, A.K., 2017. Lactic acid bacteria isolated from yak milk show probiotic potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 7635–7652.
- Kenkre, J.S., Bassett, J.H.D., 2018. The bone remodelling cycle. *Annals of Clinical Biochemistry.*
- Khalid, K., 2011. An overview of lactic acid bacteria. *Int. J. Biosci.* 1, 2220–6655.
- Khosla, S., Hofbauer, L.C., 2017. Osteoporosis treatment: recent developments and ongoing challenges. *Lancet Diabetes Endocrinol.* J. 5, 898–907.
- Kim, J.G., Lee, E., Kim, S.H., Whang, K.Y., Oh, S., Imm, J.Y., 2009. Effects of a *Lactobacillus casei* 393 fermented milk product on bone metabolism in ovariectomised rats. *Int. Dairy J.* 19, 690–695.
- Kitts, D., Weiler, K., 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources. applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr. Pharm. Des.* 9, 1309–1323.
- Kliche, T., Li, B., Bockelmann, W., Habermann, D., Klempt, M., de Vrese, M., Wutkowski, A., Clawin-Raedecker, I., Heller, K.J., 2017. Screening for proteolytically active lactic acid bacteria and bioactivity of peptide hydrolysates obtained with selected strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*

101, 7621–7633.

- Kojic, M., Fira, D., Banina, A., Topisirovic, L., 1991. Characterization of the Cell Wall-Bound Proteinase of *Lactobacillus casei* HN14. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1753–1757.
- Korhonen, H., 2009. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *J. Funct. Foods* 1, 177–187.
- Korhonen, H., Pihlanto, A., 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. *Int. Dairy J.* 16, 945–960.
- Kotzamanidis, C., Kourelis, A., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N., Yiangou, M., 2010. Evaluation of adhesion capacity, cell surface traits and immunomodulatory activity of presumptive probiotic *Lactobacillus* strains. *Int. J. Food Microbiol.* 140, 154–163.
- Kovacs-Nolan, J., Zhang, H., Ibuki, M., Nakamori, T., Yoshiura, K., Turner, P. V., Matsui, T., Mine, Y., 2012. The PepT1-transportable soy tripeptide VPY reduces intestinal inflammation. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1820, 1753–1763.
- Kruger, M.C., Fear, A., Chua, W.-H., Plimmer, G.G., Schollum, L.M., 2009. HN001 on mineral absorption and bone health in growing male and ovariectomised female rats. *Dairy Sci. Technol.* 89, 219–231.
- Kurilshikov, A., Wijmenga, C., Fu, J., Zhernakova, A., 2017. Host genetics and gut microbiome: challenges and perspectives. *Trends Immunol.* 38, 633–647.
- Kurniati, N., Mubarik, N.R., Desniar, 2015. Optimization of production of protease by *Lactobacillus plantarum* SK (5) from bekasam with response surface methodology. *Pak. J. Biotechnol* 12, 123–130.
- Kwak, H., Lee, W., Lee, M., 2012. Revisiting lactose as an enhancer of calcium absorption. *Int. Dairy J.* 22, 147–151.
- Lacou, L., Lê, S., Pezennec, S., Gagnaire, V., 2015. An in silico approach to highlight relationships between a techno-functional property of a dairy matrix and a peptide profile. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 475, 44–54.
- Lacroix, I.M.E., Li-Chan, E.C.Y., 2014. Isolation and characterization of peptides with dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity from pepsin-treated bovine whey proteins. *Peptides* 54, 39–48.
- Lacroix, I.M.E., Li-Chan, E.C.Y., 2012. Evaluation of the potential of dietary proteins as precursors of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV inhibitors by an in silico approach. *J. Funct. Foods* 4, 403–422.
- Lahtinen, S.J., 2012. Probiotic viability – does it matter? *Microb. Ecol. Heal. Dis.* 23, 10–14.
- Laiño, J.E., Juarez del Valle, M., Savoy de Giori, G., LeBlanc, J.G.J., 2014. Applicability of a *Lactobacillus amylovorus* strain as co-culture for natural folate bio-enrichment of fermented milk. *Int. J. Food Microbiol.* 191, 10–16.
- Lammi, C., Zanoni, C., Arnoldi, A., 2015. IAVPGEVA, IAVPTGVA, and LPYP, three peptides from soy glycinin, modulate cholesterol metabolism in HepG2 cells through the activation of the LDLR-SREBP2 pathway. *J. Funct. Foods* 14, 469–478.
- Lamothe, S., Rémillard, N., Tremblay, J., Britten, M., 2017. Influence of dairy matrices on nutrient release in a simulated gastrointestinal environment. *Food Res. Int.* 92, 138–146.
- Lanham-New, S.A., 2008. Importance of calcium, vitamin D and vitamin K for osteoporosis prevention and treatment. *Proc. Nutr. Soc.* 67, 163–176.
- Lê, S., Josse, J., Husson, F., 2008. FactoMineR: An R package for multivariate analysis. *J. Stat. Softw.* 25, 1–18.

- Lebeer, S., Bron, P.A., Marco, M.L., Van Pijkeren, J.P., O'Connell Motherway, M., Hill, C., Pot, B., Roos, S., Klaenhammer, T., 2018. Identification of probiotic effector molecules: present state and future perspectives. *Curr. Opin. Biotechnol.* 49, 217–223.
- Leblanc, J.G., Chain, F., Martín, R., Humarán, L.G.B., Courau, S., Langella, P., 2017. Beneficial effects on host energy metabolism of short - chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria. *Microb. Cell Fact.* 1–10.
- Leblanc, J.G., Laiño, J.E., del Valle, M.J., Vannini, V., van Sinderen, D., Taranto, M.P., de Valdez, G.F., de Giori, G.S., Sesma, F., 2011. B-Group vitamin production by lactic acid bacteria - current knowledge and potential applications. *J. Appl. Microbiol.* 111, 1297–1309.
- LeBlanc, J.G., Matar, C., Valdéz, J.C., LeBlanc, J., Perdigon, G., 2002. Immunomodulating effects of peptidic fractions issued from milk fermented with *Lactobacillus helveticus*. *J. Dairy Sci.* 85, 2733–2742.
- Lechuga, S., Ivanov, A.I., 2017. Disruption of the epithelial barrier during intestinal inflammation: Quest for new molecules and mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1864, 1183–1194.
- Li-Chan, E.C., 2015. Bioactive peptides and protein hydrolysates: research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. *Curr. Opin. Food Sci.* 1, 28–37.
- Li, C., Kwok, L.-Y., Mi, Z., Bala, J., Xue, J., Yang, J., Ma, Y., Zhang, H., Chen, Y., 2017a. Characterization of the angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of fermented milks produced with *Lactobacillus casei*. *J. Dairy Sci.* 1–13.
- Li, P., Gu, Q., Yang, L., Yu, Y., Wang, Y., 2017b. Characterization of extracellular vitamin B 12 producing *Lactobacillus plantarum* strains and assessment of the probiotic potentials. *Food Chem.* 234, 494–501.
- Li, P., Zhou, Q., Gu, Q., 2016. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* LZ227, a potential probiotic strain producing B-group vitamins. *J. Biotechnol.* 234, 66–70.
- Lilly, D.M., Stillwell, R.H., 1965. Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science.* 147, 747–748.
- Lin, L., Zhang, J., 2017. Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases. *BMC Immunol.* 18, 2.
- Lin, Y.C., Chen, Y.T., Hsieh, H.H., Chen, M.J., 2016. Effect of *Lactobacillus mali* APS1 and *L. kefiranoferiens* M1 on obesity and glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *J. Funct. Foods* 23, 580–589.
- Lin, Z. hua, Long, H. xia, Bo, Z., Wang, Y. qiang, Wu, Y. zhang, 2008. New descriptors of amino acids and their application to peptide QSAR study. *Peptides* 29, 1798–1805.
- Lindsay, R., WH, S., Neer, R., Pohl, G., Adami, S., Mautalen, C., JY, R., JJ, S., SL, M., BH, M., 2004. Sustained vertebral fracture risk reduction after withdrawal of teriparatide in postmenopausal women with osteoporosis. *Arch. Intern. Med.* 164, 2024.
- Liong, M.T., Shah, N.P., 2005. Bile salt deconjugation ability, bile salt hydrolase activity and cholesterol co-precipitation ability of lactobacilli strains. *Int. Dairy J.* 15, 391–398.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402–408.
- Lo Curto, A., Pitino, I., Mandalari, G., Dainty, J.R., Faulks, R.M., John Wickham, M.S., 2011. Survival of probiotic lactobacilli in the upper gastrointestinal tract using an *in vitro* gastric model of digestion. *Food Microbiol.* 28, 1359–1366.

- Lourens-Hattingh, A., Viljoen, B.C., 2001. Yogurt as probiotic carrier food. *Int. Dairy J.* 11, 1–17.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, L.A., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Lu, Z., Ding, L., Lu, Q., Chen, Y.-H., 2013. Claudins in intestines. *Tissue Barriers* 1, e24978.
- Ma, Z.J., Yamaguchi, M., 2000. Synergistic effect of genistein and casein phosphopeptides on bone components in young and elderly female rats. *Journal of Health Science.* 46, 474–479.
- Mack, D.R., Ahrne, S., Hyde, L., Wei, S., Hollingsworth, M.A., 2003. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells *in vitro*. *Gut* 52, 827–833.
- Mada, S.B., Reddi, S., Kumar, N., Kumar, R., Kapila, S., Kapila, R., Trivedi, R., Karvande, A., Ahmad, N., 2017. Antioxidative peptide from milk exhibits antiosteopenic effects through inhibition of oxidative damage and bone-resorbing cytokines in ovariectomized rats. *Nutrition* 43–44, 21–31.
- Majumder, K., Mine, Y., Wu, J., 2016. The potential of food protein-derived anti-inflammatory peptides against various chronic inflammatory diseases. *J. Sci. Food Agric.* 96, 2303–2311.
- Manolagas, S.C., 2014. Wnt signaling and osteoporosis. *Maturitas* 78, 233–237.
- Marco, M.L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C.J., Cotter, P.D., Foligné, B., Gänzle, M., Kort, R., Pasin, G., Pihlanto, A., Smid, E.J., Hutkins, R., 2017. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Curr. Opin. Biotechnol.* 44, 94–102.
- Marie, P.J., Cohen-Solal, M., 2018. The expanding life and functions of osteogenic cells: from simple bone-making cells to multifunctional cells and beyond. *J. Bone Miner. Res.* 33, 199–210.
- Martínez-Augustin, O., Rivero-Gutiérrez, B., Mascaraque, C., de Medina, F.S., 2014. Food derived bioactive peptides and intestinal barrier function. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 22857–22873. ht
- Martirosyan, D.M., Singh, J., 2015. A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique? *Funct. Foods Heal. Dis.* 5, 209–223.
- Matar, C., Amiot, J., Savoie, L., Goulet, J., 1996. The effect of milk fermentation by *Lactobacillus helveticus* on the release of peptides during *in vitro* digestion. *J. Dairy Sci.* 79, 971–9.
- Matar, C., Valdez, J.C., Medina, M., Rachid, M., Perdigon, G., 2001. Immunomodulating effects of milks fermented by *Lactobacillus helveticus* and its non-proteolytic variant. *J. Dairy Res.* 68, 601–609.
- Mays, Z.J., Nair, N.U., 2018. Synthetic biology in probiotic lactic acid bacteria: At the frontier of living therapeutics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 53, 224–231.
- McCabe, L.R., Irwin, R., Schaefer, L., Britton, R.A., 2013. Probiotic use decreases intestinal inflammation and increases bone density in healthy male but not female mice. *J Cell Physiol* 228, 1793–1798.
- McCabe, L.R., Parameswaran, N., 2018. Advances in probiotic regulation of bone and mineral metabolism. *Calcif. Tissue Int.* 102, 480–488.
- McClung, M.R., Geusens, P., Miller, P.D., Zippel, H., Bensen, W.G., Roux, C., Adami, S., Fogelman, I., Diamond, T., Eastell, R., Meunier, P.J., Reginster, J.-Y., 2001. Effect of risedronate on the risk of hip fracture in elderly women. *N. Engl. J. Med.* 344, 333–340.
- McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., 1997. Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening. *Lait* 77, 41–76.
- Mello, A.M., Paroni, G., Daragjati, J., Pilotto, A., 2016. Gastrointestinal microbiota and their contribution to healthy aging. *Dig. Dis.* 34, 194–201.

- Messaoudi, S., Madi, A., Prévost, H., Feuilloley, M., Manai, M., Dousset, X., Connil, N., 2012. *In vitro* evaluation of the probiotic potential of *Lactobacillus salivarius* SMXD51. *Anaerobe* 18, 584–589.
- Meunier, P.J., Roux, C., Seeman, E., Ortolani, S., Badurski, J.E., Spector, T.D., Cannata, J., Balogh, A., Lemmel, E.-M., Pors-Nielsen, S., Rizzoli, R., Genant, H.K., Reginster, J.-Y., 2004. The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* 350, 459–468.
- Mikelsaar, M., Zilmer, M., 2009. *Lactobacillus fermentum* ME-3 - an antimicrobial and antioxidative probiotic. *Microb. Ecol. Health Dis.* 21, 1–27.
- Miner-Williams, W.M., Stevens, B.R., Moughan, P.J., 2014. Are intact peptides absorbed from the healthy gut in the adult human? *Nutr. Res. Rev.* 27, 308–329.
- Minervini, F., Algaron, F., Rizzello, C.G., Fox, P.F., Monnet, V., Gobbetti, M., 2003. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5297–5305.
- Minkiewicz, P., Dziuba, J., Iwaniak, A., Dziuba, M., Darewicz, M., 2008. BIOPEP database and other programs for processing bioactive peptide sequences, *Journal of AOAC International*. 965–980.
- Miyamoto, M., Ueno, H.M., Watanabe, M., Tatsuma, Y., Seto, Y., Miyamoto, T., Nakajima, H., 2015. Distinctive proteolytic activity of cell envelope proteinase of *Lactobacillus helveticus* isolated from airag, a traditional Mongolian fermented mare's milk. *Int. J. Food Microbiol.* 197, 65–71.
- Mohajeri, M.H., Brummer, R.J.M., Rastall, R.A., Weersma, R.K., Harmsen, H.J.M., Faas, M., Eggersdorfer, M., 2018. The role of the microbiome for human health: from basic science to clinical applications. *Eur. J. Nutr.* 57, 1–14.
- Mohanty, D.P., Mohapatra, S., 2016. Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review. *Saudi J. Biol. Sci.* 23, 577–583.
- Mokrozub, V. V., Lazarenko, L.M., Sichel, L.M., Babenko, L.P., Lytvyn, P.M., Demchenko, O.M., Melnichenko, Y.O., Boyko, N. V., Biavati, B., DiGioia, D., Bubnov, R. V., Spivak, M.Y., 2015. The role of beneficial bacteria wall elasticity in regulating innate immune response. *EPMA J.* 6, 13.
- Mollica, A., Zengin, G., Durdagi, S., Ekhteiari Salmas, R., Macedonio, G., Stefanucci, A., Dimmito, M.P., Novellino, E., 2018. Combinatorial peptide library screening for discovery of diverse α -glucosidase inhibitors using molecular dynamics simulations and binary QSAR models. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1102, 1–15.
- Mooney, C., Haslam, N.J., Holton, T.A., Pollastri, G., Shields, D.C., 2013. PeptideLocator: prediction of bioactive peptides in protein sequences. *Bioinformatics* 29, 1120–1126.
- Nagai, T., Makino, S., Ikegami, S., Itoh, H., Yamada, H., 2011. Effects of oral administration of yogurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1 and its exopolysaccharides against influenza virus infection in mice. *Int. Immunopharmacol.* 11, 2246–2250.
- Nakagawa, H., Shiozaki, T., Kobatake, E., Hosoya, T., Moriya, T., Sakai, F., Taru, H., Miyazaki, T., 2016. Effects and mechanisms of longevity induced by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 15, 227–236.
- Narva, M., Collin, M., Lamberg-Allardt, C., Kärkkäinen, M., Poussa, T., Vapaatalo, H., Korpela, R., 2004a. Effects of long-term intervention with *Lactobacillus helveticus*-fermented milk on bone mineral density and bone mineral content in growing rats. *Ann. Nutr. Metab.* 48, 228–234.
- Narva, M., Nevala, R., Poussa, T., Korpela, R., 2004b. The effect of *Lactobacillus helveticus* fermented milk on acute changes in calcium metabolism in postmenopausal women. *Eur. J. Nutr.* 43, 61–68.
- Neer, R.M., Arnaud, C.D., Zanchetta, J.R., Prince, R., Gaich, G.A., Reginster, J.Y., Hodsman, A.B.,

- Eriksen, E.F., Ish-Shalom, S., Genant, H.K., Wang, O., Mitlak, B.H., 2001. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* 344, 1434–41.
- Nielsen, S.D., Beverly, R.L., Qu, Y., Dallas, D.C., 2017. Milk bioactive peptide database: A comprehensive database of milk protein-derived bioactive peptides and novel visualization. *Food Chem.* 232, 673–682.
- Nilsson, A.G., Sundh, D., Bäckhed, F., Lorentzon, M., 2018. *Lactobacillus reuteri* reduces bone loss in older women with low bone mineral density: a randomized, placebo-controlled, double-blind, clinical trial. *J. Intern. Med.* 307–317.
- Nongonierma, A.B., Fitzgerald, R.J., 2017. Features of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides from dietary proteins 1–11.
- Nongonierma, A.B., Fitzgerald, R.J., 2016a. Structure activity relationship modelling of milk protein-derived peptides with dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory activity. *Peptides* 79, 1–7.
- Nongonierma, A.B., Fitzgerald, R.J., 2016b. Learnings from quantitative structure–activity relationship (QSAR) studies with respect to food protein-derived bioactive peptides: a review. *RSC Adv.* 6, 75400–75413.
- Nongonierma, A.B., FitzGerald, R.J., 2017a. Strategies for the discovery and identification of food protein-derived biologically active peptides. *Trends Food Sci. Technol.* 69, 289–305.
- Nongonierma, A.B., FitzGerald, R.J., 2017b. Enhancing bioactive peptide release and identification using targeted enzymatic hydrolysis of milk proteins. *Anal. Bioanal. Chem.* 1–17.
- Nongonierma, A.B., FitzGerald, R.J., 2016. Strategies for the discovery, identification and validation of milk protein-derived bioactive peptides. *Trends Food Sci. Technol.* 50, 26–43.
- Nongonierma, A.B., FitzGerald, R.J., 2015. The scientific evidence for the role of milk protein-derived bioactive peptides in humans: A Review. *J. Funct. Foods* 17, 640–656.
- Nongonierma, A.B., FitzGerald, R.J., 2013. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) by proline containing casein-derived peptides. *J. Funct. Foods* 5, 1909–1917.
- Nongonierma, A.B., Mazzocchi, C., Paoletta, S., FitzGerald, R.J., 2017. Release of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides from milk protein isolate (MPI) during enzymatic hydrolysis. *Food Res. Int.* 94, 79–89.
- Nordin, B.C., Need, A.G., Morris, H.A., O’Loughlin, P.D., Horowitz, M., 2004. Effect of age on calcium absorption in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 80, 998–1002.
- Nour, I., Fattouh, F., El-Adawi, H., 2014. Chemically defined medium for optimization of proteolytic activity of *Lactobacillus bulgaricus* 761N. *Int. J. Life Sci. Med. Res.* 4, 46–56.
- O’Neill, S., O’Driscoll, L., 2015. Metabolic syndrome: A closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obes. Rev.* 16, 1–12. h
- O’Toole, P.W., Marchesi, J.R., Hill, C., 2017. Next-generation probiotics: The spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nat. Microbiol.* 2, 1–6.
- Oberg, C.J., Broadbent, J.R., Strickland, M., McMahon, D.J., 2002. Diversity in specificity of the extracellular proteinases in *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 34, 455–460.
- Oelschlaeger, T.A., 2010. Mechanisms of probiotic actions - A review. *Int. J. Med. Microbiol.* 300, 57–62.
- Ohlsson, C., Sjögren, K., 2015. Effects of the gut microbiota on bone mass. *Trends Endocrinol. Metab.*

26, 69–74.

- Ohsawa, K., Satsu, H., Ohki, K., Enjoh, M., Takano, T., Shimizu, M., 2008. Producibility and digestibility of antihypertensive β -casein tripeptides, Val-pro-pro and Ile-pro-pro, in the gastrointestinal tract: Analyses using an in vitro model of mammalian gastrointestinal digestion, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, 854–858.
- Oommen, B.S., McMahon, D.J., Oberg, C.J., Broadbent, J.R., Strickland, M., 2002. Proteolytic specificity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* influences functional properties of Mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.* 85, 2750–2758.
- Ouwehand, A.C., Salminen, S., 2003. In vitro Adhesion assays for probiotics and their in vivo relevance: A review. *Microb. Ecol. Health Dis.* 15, 175–184.
- Pailin, T., Kang, D.H., Schmidt, K., Fung, D.Y.C., 2001. Detection of extracellular bound proteinase in EPS-producing lactic acid bacteria cultures on skim milk agar. *Lett. Appl. Microbiol.* 33, 45–49.
- Pan, X., Chen, F., Wu, T., Tang, H., Zhao, Z., 2009. The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *Food Control* 20, 598–602.
- Panchaud, A., Affolter, M., Kussmann, M., 2012. Mass spectrometry for nutritional peptidomics: How to analyze food bioactives and their health effects. *J. Proteomics* 75, 3546–3559.
- Pandey, M.K., Gupta, S.C., Karelia, D., Gilhooley, P.J., Shakibaei, M., Aggarwal, B.B., 2018. Dietary nutraceuticals as backbone for bone health. *Biotechnol. Adv.*
- Papagianni, M., 2012. Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of industrially important compounds. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 3, 1–8.
- Park, Y.W., Nam, M.S., 2015. Bioactive peptides in milk and dairy products: A review. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* 35, 831–840.
- Parker, E.A., Roy, T., D'Adamo, C.R., Wieland, L.S., 2018. Probiotics and gastrointestinal conditions: An overview of evidence from the Cochrane Collaboration. *Nutrition* 45, 125–134.e11.
- Parker, R.B., 1974. Probiotics: the other half of the antibiotic story. *Anim. Nutr. Heal.* 29, 4–8.
- Parkinson, G.B., Cransberg, P.H., 2004. Effect of casein phosphopeptide and 25-hydroxycholecalciferol on tibial dyschondroplasia in growing broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* 45, 802–806.
- Parvaneh, K., Ebrahimi, M., Sabran, M.R., Karimi, G., Hwei, A.N.M., Abdul-Majeed, S., Ahmad, Z., Ibrahim, Z., Jamaluddin, R., 2015. Probiotics (*Bifidobacterium longum*) increase bone mass density and upregulate Sparc and Bmp-2 genes in rats with bone loss resulting from ovariectomy. *Biomed Res. Int.* 2015.
- Parvaneh, K., Jamaluddin, R., Karimi, G., Erfani, R., 2014. Effect of probiotics supplementation on bone mineral content and bone mass density. *Sci. World J.* 2014.
- Patel, R., Hati, S., 2018. Production of antihypertensive (angiotensin I-converting enzyme inhibitory) peptides derived from fermented milk supplemented with WPC70 and calcium caseinate by *Lactobacillus* cultures. *Rev. Med. Microbiol.* 29, 30–40.
- Pavel, A.B., Vasile, C.I., 2012. PyElph - a software tool for gel images analysis and phylogenetics. *BMC Bioinformatics* 13.
- Pederson, J.A., Mileski, G.J., Weimer, B.C., Steele, J.L., 1999. Genetic characterization of a cell envelope-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *J. Bacteriol.* 181, 4592–4597.
- Perego, S., Del Favero, E., De Luca, P., Dal Piaz, F., Fiorilli, A., Cantu', L., Ferraretto, A., 2015. Calcium bioaccessibility and uptake by human intestinal like cells following in vitro digestion of

- casein phosphopeptide–calcium aggregates. *Food Funct.* 6, 1796–1807.
- Perego, S., Zabeo, A., Marasco, E., Giussani, P., Fiorilli, A., Tettamanti, G., Ferraretto, A., 2013. Casein phosphopeptides modulate calcium uptake and apoptosis in Caco2 cells through their interaction with the TRPV6 calcium channel. *J. Funct. Foods* 5, 847–857.
- Pereira, D.I. a, Gibson, G.R., 2002. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4689–4693.
- Pérez, A. V., Picotto, G., Carpentieri, A.R., Rivoira, M.A., Peralta Lopez, M.E., Tolosa De Talamoni, N.G., 2008. Minireview on regulation of intestinal calcium absorption: Emphasis on molecular mechanisms of transcellular pathway. *Digestion* 77, 22–34.
- Pescuma, M., Hébert, E.M., Haertlé, T., Chobert, J.M., Mozzi, F., Font De Valdez, G., 2015. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 454 cleaves allergenic peptides of β -lactoglobulin. *Food Chem.* 170, 407–414.
- Petschow, B., Doré, J., Hibberd, P., Dinan, T., Reid, G., Blaser, M., Cani, P.D., Degnan, F.H., Foster, J., Gibson, G., Hutton, J., Klaenhammer, T.R., Ley, R., Nieuwdorp, M., Pot, B., Relman, D., Serazin, A., Sanders, M.E., 2013. Probiotics, prebiotics, and the host microbiome: The science of translation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1306, 1–17.
- Picariello, G., Ferranti, P., Fierro, O., Mamone, G., Caira, S., Di, A., Monica, S., Addeo, F., 2010. Peptides surviving the simulated gastrointestinal digestion of milk proteins: Biological and toxicological implications. *Journal of Chromatography B.* 878, 295–308.
- Picariello, G., Iacomino, G., Mamone, G., Ferranti, P., Fierro, O., Gianfrani, C., Di Luccia, A., Addeo, F., 2013. Transport across Caco-2 monolayers of peptides arising from *in vitro* digestion of bovine milk proteins. *Food Chem.* 139, 203–212.
- Pihlanto, A., 2013. Lactic fermentation and bioactive peptides, in: *Lactic Acid Bacteria – R & D for Food, Health and Livestock Purposes.* 310–331.
- Pitino, I., Randazzo, C.L., Mandalari, G., Lo Curto, A., Faulks, R.M., Le Marc, Y., Bisignano, C., Caggia, C., Wickham, M.S.J., 2010. Survival of *Lactobacillus rhamnosus* strains in the upper gastrointestinal tract. *Food Microbiol.* 27, 1121–1127.
- Pripp, A.H., Isaksson, T., Stepaniak, L., Sørhaug, T., 2004. Quantitative structure-activity relationship modelling of ACE-inhibitory peptides derived from milk proteins. *Eur. Food Res. Technol.* 219, 579–583.
- Pu, F., Chen, N., Xue, S., 2016. Calcium intake, calcium homeostasis and health. *Food Sci. Hum. Wellness* 5, 8–16.
- Ramachandran, R., Altier, C., Oikonomopoulou, K., Hollenberg, M.D., 2016. Proteinases, their extracellular targets, and inflammatory signaling. *Pharmacol. Rev.* 68, 1110–1142.
- Ramos, C.L., Thorsen, L., Schwan, R.F., Jespersen, L., 2013. Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. *Food Microbiol.* 36, 22–29.
- Ramsey, W., Isales, C.M., 2017. Understanding the gut-bone signaling axis. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 1033, 13–33.
- Raveschot, C., Cudennec, B., Coutte, F., Flahaut, C., Fremont, M., Drider, D., Dhulster, P., 2018. Production of bioactive peptides by *Lactobacillus* species: from gene to application. *Front. Microbiol.* 9, 2354.
- Ravindran, R., Jaiswal, A.K., 2016. Exploitation of food industry waste for high-value products. *Trends Biotechnol.* 34, 58–69.

- Reddi, S., Shanmugam, V.P., Tanedjeu, K.S., Kapila, S., Kapila, R., 2018. Effect of buffalo casein-derived novel bioactive peptides on osteoblast differentiation. *Eur. J. Nutr.* 57, 593–605.
- Reed, K.K., Wickham, R., 2009. Review of the gastrointestinal tract: From macro to micro. *Semin. Oncol. Nurs.* 25, 3–14.
- Reid, I.R., 2015. Short-term and long-term effects of osteoporosis therapies. *Nat. Rev. Endocrinol.* 11, 418–428.
- Ren, X., Pan, D., Wu, Z., Zeng, X., Sun, Y., Cao, J., Guo, Y., 2015. Limited hydrolysis of β -casein by cell wall proteinase and its effect on hydrolysates's conformational and structural properties. *Int. J. Food Sci. Technol.* 50, 55–61.
- Rianon, N., Ambrose, C.G., Pervin, H., Garcia, M., Mama, S.K., Schwartz, A. V., Lee, B., Harris, T., 2017. Long-term use of angiotensin-converting enzyme inhibitors protects against bone loss in African-American elderly men. *Arch. Osteoporos.* 12, 1–8.
- Rigolet, P., Xi, X.G., Rety, S., Chich, J.F., 2005. The structural comparison of the bacterial PepX and human DPP-IV reveals sites for the design of inhibitors of PepX activity. *FEBS J.* 272, 2050–2059.
- Rindi, G., Grant, S.G., Yiangou, Y., Ghati, M.A., Bloom, S.R., Bautch, V.L., Solcia, E., Polak, J.M., 1990. Development of neuroendocrine tumors in the gastrointestinal tract of transgenic mice. Heterogeneity of hormone expression. *Am. J. Pathol.* 136, 1349–63.
- Rizzello, C.G., Lorusso, A., Russo, V., Pinto, D., Marzani, B., Gobbetti, M., 2017. Improving the antioxidant properties of quinoa flour through fermentation with selected autochthonous lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 241, 252–261.
- Rizzoli, R., Biver, E., 2017. Effects of fermented milk products on bone. *Calcif. Tissue Int.* 102, 489–500.
- Rodríguez, J.M., Murphy, K., Stanton, C., Ross, R.P., Kober, O.I., Juge, N., Avershina, E., Rudi, K., Narbad, A., Jenmalm, M.C., Marchesi, J.R., Collado, M.C., 2015. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb. Ecol. Health Dis.* 26, 26050.
- Rodríguez, P.F., Arévalo-villena, M., Rosa, I.Z., Pérez, A.B., 2018. Selection of potential non-*Sacharomyces* probiotic yeasts from food origin by a step-by-step approach. *Food Res. Int.* 112, 1–12.
- Rossi, M., Amaretti, A., Raimondi, S., 2011. Folate production by probiotic bacteria. *Nutrients* 3, 118–134.
- Rossouw, J.E., Prentice, R.L., Manson, J.E., Ko, M., Lacroix, A.Z., Margolis, K.L., Stefanick, M.L., 2007. Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause. *J. Am. Med. Assoc.* 297, 1465–1478.
- Russell, R.G.G., Watts, N.B., Ebetino, F.H., Rogers, M.J., 2008. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos. Int.* 19, 733–759.
- Rutella, G.S., Solieri, L., Martini, S., Tagliazucchi, D., 2016a. Release of the antihypertensive tripeptides valine-proline-proline and isoleucine-proline-proline from bovine milk caseins during *in vitro* gastrointestinal digestion. *J. Agric. Food Chem.* 64, 8509–8515.
- Rutella, G.S., Tagliazucchi, D., Solieri, L., 2016b. Survival and bioactivities of selected probiotic lactobacilli in yogurt fermentation and cold storage: New insights for developing a bi-functional dairy food. *Food Microbiol.* 60, 54–61.
- Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J.M., Bressollier, P., 2013. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Sci. Technol.* 50, 1–16.
- Sadat-Mekmene, L., Genay, M., Atlan, D., Lortal, S., Gagnaire, V., 2011a. Original features of cell-

- envelope proteinases of *Lactobacillus helveticus*. A review. *Int. J. Food Microbiol.* 146, 1–13.
- Sadat-Mekmene, L., Jardin, J., Corre, C., Mollé, D., Richoux, R., Delage, M.M., Lortal, S., Gagnaire, V., 2011b. Simultaneous presence of PrtH and PrtH2 proteinases in *Lactobacillus helveticus* strains improves breakdown of the pure α s1-casein. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 179–186.
- Sadat-Mekmene, L., Richoux, R., Aubert-Frogerais, L., Madec, M., Corre, C., Piot, M., Jardin, J., le Feunteun, S., Lortal, S., Gagnaire, V., 2013. *Lactobacillus helveticus* as a tool to change proteolysis and functionality in Swiss-type cheeses. *J. Dairy Sci.* 96, 1455–1470.
- Salminen, S., Von Wright, A., Morelli, L., Philippe, M., Brassart, D., de Vos, W., Fondén, R., Maija, S., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S., Mattila-Sandholm, T., 1998. Demonstration of safety of probiotics — a review. *Int. J. Food Microbiol.* 44, 93–106.
- Salvetti, E., O'Toole, P.W., 2017. The genomic basis of Lactobacilli as health-promoting organisms. *Microbiol. Spectr.* 5, 49–71.
- Sánchez-Rivera, L., Martínez-Maqueda, D., Cruz-Huerta, E., Miralles, B., Recio, I., 2014. Peptidomics for discovery, bioavailability and monitoring of dairy bioactive peptides. *Food Res. Int.* 63, 170–181.
- Sanchez, B., Delgado, S., Blanco-Miguez, A., Lourenço, A., Gueimonde, M., Margolles, A., 2017. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Mol. Nutr. Food Res.* 61, 1–15.
- Sanchón, J., Fernández-Tomé, S., Miralles, B., Hernández-Ledesma, B., Tomé, D., Gaudichon, C., Recio, I., 2018. Protein degradation and peptide release from milk proteins in human jejunum. Comparison with in vitro gastrointestinal simulation. *Food Chem.* 239, 486–494.
- Sanders, M.E., Benson, A., Lebeer, S., Merenstein, D.J., Klaenhammer, T.R., 2018. Shared mechanisms among probiotic taxa: implications for general probiotic claims. *Curr. Opin. Biotechnol.* 49, 207–216.
- Sanggaard, K.M., Holst, J.J., Rehfeld, J.F., Sandström, B., Raben, A., Tholstrup, T., 2004. Different effects of whole milk and a fermented milk with the same fat and lactose content on gastric emptying and postprandial lipaemia, but not on glycaemic response and appetite. *Br. J. Nutr.* 92, 447.
- Sanguineti, R., Puddu, A., Mach, F., Montecucco, F., Viviani, G.L., 2014. Advanced glycation end products play adverse proinflammatory activities in osteoporosis. *Mediators Inflamm.* 2014, 975872.
- Saulnier, D.M., Ringel, Y., Heyman, M.B., Foster, J.A., Bercik, P., Shulman, R.J., Versalovic, J., Verdu, E.F., Dinan, T.G., Hecht, G., Guarner, F., 2013. The intestinal microbiome, probiotics and prebiotics in neurogastroenterology. *Gut Microbes* 4, 17–27.
- Savijoki, K., Ingmer, H., Varmanen, P., 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 394–406.
- Scholz-Ahrens, K.E., Ade, P., Marten, B., Weber, P., Timm, W., Açil, Y., Glüer, C.-C., Schrezenmeir, J., 2007. Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content, and bone structure. *J. Nutr.* 137, 838S–46S.
- Scholz-Ahrens, K.E., Adolphi, B., Rochat, F., Barclay, D. V., de Vrese, M., Açil, Y., Schrezenmeir, J., 2016. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on mineral metabolism in ovariectomized rats — impact of bacterial mass, intestinal absorptive area and reduction of bone turn-over. *NFS J.* 3, 41–50.
- Scholz-Ahrens, K.E., Schrezenmeir, J., 2000. Effects of bioactive substances in milk on mineral and trace element metabolism with special reference to casein phosphopeptides. *Br. J. Nutr.* 84 1, 147–

53.

- Scott, K.P., Gratz, S.W., Sheridan, P.O., Flint, H.J., Duncan, S.H., 2013. The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacol. Res.* 69, 52–60.
- Sengupta, R., Altermann, E., Anderson, R.C., McNabb, W.C., Moughan, P.J., Roy, N.C., 2013. The role of cell surface architecture of Lactobacilli in host-microbe interactions in the gastrointestinal tract. *Mediators Inflamm.* 2013, 1–16.
- Sentandreu, M.A., Toldrá, F., 2006. A fluorescence-based protocol for quantifying angiotensin-converting enzyme activity. *Nat. Protoc.* 1, 2423–7.
- Shanbhogue, V. V, Mitchell, D.M., Rosen, C.J., Bouxsein, M.L., 2015. Type 2 diabetes and the skeleton : new insights into sweet bones. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 8587, 1–15.
- Sharma, S., Kanwar, S.S., 2017. Adherence potential of indigenous lactic acid bacterial isolates obtained from fermented foods of Western Himalayas to intestinal epithelial Caco-2 and HT-29 cell lines. *J. Food Sci. Technol.* 54, 3504–3511.
- Sharma, S., Singh, R., Rana, S., 2011. Bioactive peptides: A review. *Int. J. Bioautomation* 15, 223–250.
- Shewale, R.N., Sawale, P.D., Khedkar, C.D., Singh, A., 2014. Selection criteria for probiotics: A review. *Int. J. Probiotics Prebiotics* 9, 17–22.
- Shuangquan, Tsuda, H., Miyamoto, T., 2008. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in skim milk fermented with *Lactobacillus helveticus* 130B4 from camel milk in Inner Mongolia, China. *J. Sci. Food Agric.* 88, 2688–2692.
- Sinclair, E.M., Drucker, D.J., 2013. Proglucagon-derived peptides: Mechanisms of action and therapeutic potential. 20, 357–365.
- Singh, B.P., Vij, S., 2017. Growth and bioactive peptides production potential of *Lactobacillus plantarum* strain C2 in soy milk: A LC-MS/MS based revelation for peptides biofunctionality, *LWT - Food Science and Technology*. Elsevier Ltd.
- Sjögren, K., Engdahl, C., Henning, P., Lerner, U.H., Tremaroli, V., Lagerquist, M.K., Bäckhed, F., Ohlsson, C., 2012. The gut microbiota regulates bone mass in mice. *J. Bone Miner. Res.* 27, 1357–1367.
- Skibsted, L.H., 2016. Mineral nutrient interaction: Improving bioavailability of calcium and iron. *Food Sci. Biotechnol.* 25, 1233-1241.
- Solanki, D., Hati, S., Sakure, A., 2017. *In silico* and *in vitro* analysis of novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory bioactive peptides derived from fermented camel milk (*Camelus dromedarius*). *Int. J. Pept. Res. Ther.* 23, 441–459.
- Soleymanzadeh, N., Mirdamadi, S., Kianirad, M., 2016. Antioxidant activity of camel and bovine milk fermented by lactic acid bacteria isolated from traditional fermented camel milk (Chal). *Dairy Sci. Technol.* 96, 443–457.
- Soto, A., Martín, V., Jiménez, E., Mader, I., Rodríguez, J.M., Fernández, L., 2014a. Lactobacilli and bifidobacteria in human breast milk: Influence of antibiotherapy and other host and clinical factors. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 59, 78–88.
- Soto, A.M., Morales, P., Haza, A.I., García, M.L., Selgas, M.D., 2014b. Bioavailability of calcium from enriched meat products using Caco-2 cells. *Food Res. Int.* 55, 263–270.
- Soysa, N.S., Alles, N., 2016. Osteoclast function and bone-resorbing activity: An overview. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 476, 115-120.
- Stathopoulos, I.P., Ballas, E.G., Lampropoulou-Adamidou, K., Trovas, G., 2014. A review on

- osteoporosis in men. *Hormones* 13, 441–457.
- Stefanovic, E., Fitzgerald, G., McAuliffe, O., 2017. Advances in the genomics and metabolomics of dairy lactobacilli: A review. *Food Microbiol.* 61, 33–49.
- Stefanucci, A., Mollica, A., Macedonio, G., Zengin, G., Ahmed, A.A., Novellino, E., 2018. Exogenous opioid peptides derived from food proteins and their possible uses as dietary supplements: A critical review, *Food Reviews International*.
- Sun, H., Chang, Q., Liu, L., Chai, K., Lin, G., Huo, Q., Zhao, Z., Zhao, Z., 2017. High-throughput and rapid screening of novel ACE inhibitory peptides from Sericin source and inhibition mechanism by using *in silico* and *in vitro* prescriptions. *J. Agric. Food Chem.* 65, 10020–10028.
- Sun, Z., Harris, H.M.B., McCann, A., Guo, C., Argimón, S., Zhang, W., Yang, X., Jeffery, I.B., Cooney, J.C., Kagawa, T.F., Liu, W., Song, Y., Salvetti, E., Wrobel, A., Rasinkangas, P., Parkhill, J., Rea, M.C., O’Sullivan, O., Ritari, J., Douillard, F.P., Paul Ross, R., Yang, R., Briner, A.E., Felis, G.E., De Vos, W.M., Barrangou, R., Klaenhammer, T.R., Caufield, P.W., Cui, Y., Zhang, H., O’Toole, P.W., 2015. Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. *Nat. Commun.* 6, 8322.
- Taha, S., El Abd, M., De Gobba, C., Abdel-Hamid, M., Khalil, E., Hassan, D., 2017. Antioxidant and antibacterial activities of bioactive peptides in buffalo’s yoghurt fermented with different starter cultures. *Food Sci. Biotechnol.* 26, 1325–1332.
- Taleghani, H.G., Ghoreyshi, A.A., Najafpour, G., 2017. Lactic acid production with *in situ* extraction in membrane bioreactor. *Appl. Food Biotechnol.* 4, 27–34.
- Tanner, G., Matthews, K., Roeder, H., Konopasek, M., Bussard, A., Gregory, T., 2018. Current and future uses of probiotics. *J. Am. Acad. Physician Assist.* 31, 29–33.
- Thakur, K., Tomar, S.K., De, S., 2016. Lactic acid bacteria as a cell factory for riboflavin production. *Microb. Biotechnol.* 9, 441–451.
- Torres, A.C., Vannini, V., Bonacina, J., Font, G., Saavedra, L., Taranto, M.P., 2016. Cobalamin production by *Lactobacillus coryniformis*: Biochemical identification of the synthesized corrinoïd and genomic analysis of the biosynthetic cluster. *BMC Microbiol.* 16, 1–9.
- Toscano, M., De Grandi, R., Pastorelli, L., Vecchi, M., Drago, L., 2017. A consumer’s guide for probiotics: 10 golden rules for a correct use. *Dig. Liver Dis.* 49, 1177–1184.
- Tou, J.C., 2014. Resveratrol supplementation affects bone acquisition and osteoporosis: Pre-clinical evidence toward translational diet therapy. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1852, 1186–1194.
- Tsuchita, H., Goto, T., Shimizu, T., Yonehara, Y., Kuwata, T., 1996. Dietary casein phosphopeptides prevent bone loss in aged ovariectomized rats. *Biochem. Mol. Roles Nutr.* 86–93.
- Tulipano, G., Bulgari, O., Chessa, S., Nardone, A., Cocchi, D., Caroli, A., 2010. Direct effects of casein phosphopeptides on growth and differentiation of *in vitro* cultured osteoblastic cells (MC3T3-E1). *Regul. Pept.* 160, 168–174.
- Tuomola, E.M., Salminen, S.J., 1998. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *Int. J. Food Microbiol.* 41, 45–51.
- Ubbink, J., Schär-Zammaretti, P., 2003. The cell wall of lactic acid bacteria: Surface constituents and macromolecular conformations. *Eur. Cells Mater.* 6, 108.
- Udenigwe, C.C., 2014. Bioinformatics approaches , prospects and challenges of food bioactive peptide research. *Trends Food Sci. Technol.* 36, 137–143.
- Ulluwishewa, D., Anderson, R.C., McNabb, W.C., Moughan, P.J., Wells, J.M., Roy, N.C., 2011.

- Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *J. Nutr.* 141, 769–776.
- Vaiserman, A.M., Koliada, A.K., Marotta, F., 2017. Gut microbiota: A player in aging and a target for anti-aging intervention. *Ageing Res. Rev.* 35, 36–45.
- Van Cromphaut, S.J., Dewerchin, M., Hoenderop, J.G.J., Stockmans, I., Van Herck, E., Kato, S., Bindels, R.J.M., Collen, D., Carmeliet, P., Bouillon, R., Carmeliet, G., 2001. Duodenal calcium absorption in vitamin D receptor-knockout mice: Functional and molecular aspects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 13324–13329.
- Vázquez, C., Botella-Carretero, J.I., García-Albiach, R., Pozuelo, M.J., Rodríguez-Baños, M., Baquero, F., Baltadjieva, M. a, del Campo, R., 2013. Screening in a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* collection to select a strain able to survive to the human intestinal tract. *Nutr. Hosp.* 28, 1227–35.
- Villa, C.R., Ward, W.E., Comelli, E.M., 2017. Gut microbiota-bone axis. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57, 1664–1672.
- Vinderola, C.G., Medici, M., Perdígón, G., 2004. Relationship between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 96, 230–243.
- Vinderola, C.G., Reinheimer, J.A., 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: A comparative “*in vitro*” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Res. Int.* 36, 895–904.
- Volcan, S., Castagliuolo, I., Elli, M., Longo, S., Brun, P., Inca, R.D., Porzionato, A., Macchi, V., Palu, G., Sturniolo, G.C., Morelli, L., Martines, D., 2007. Aggregating phenotype in *Lactobacillus crispatus* determines intestinal colonization and TLR2 and TLR4 modulation in murine colonic mucosa 14, 1138–1148.
- Vukotić, G., Strahinić, I., Begović, J., Lukić, J., Kojić, M., Fira, D., 2016. Survey on proteolytic activity and diversity of proteinase genes in mesophilic lactobacilli. *Microbiology* 85, 33–41.
- Wakai, T., Yanamoto, N., 2012. Antihypertensive peptides specific to *Lactobacillus helveticus* fermented milk, in: Sammour, R. (Ed.), *Biotechnology - Molecular Studies and Novel Applications for Improved Quality of Human Life*. pp. 159–172.
- Walsh, J.S., 2015. Normal bone physiology, remodelling and its hormonal regulation. *Surg. (United Kingdom)* 33, 1–6.
- Weaver, C., 2015. Diet, gut microbiome, and bone health. *Curr. Osteoporos. Rep.* 13, 125–130.
- Wegkamp, A., Teusink, B., De Vos, W.M., Smid, E.J., 2010. Development of a minimal growth medium for *Lactobacillus plantarum*. *Lett. Appl. Microbiol.* 50, 57–64.
- Wegman-Ostrosky, T., Soto-Reyes, E., Vidal-Millán, S., Sánchez-Corona, J., 2015. The renin-angiotensin system meets the hallmarks of cancer. *JRAAS - J. Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst.* 16, 227–233.
- Welman, A.D., Maddox, I.S., 2003. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Perspectives and challenges. *Trends Biotechnol.* 21, 269–274.
- Whisner, C.M., Castillo, L.F., 2018. Prebiotics, Bone and Mineral Metabolism. *Calcif. Tissue Int.* 102, 443–479.
- Wong, T.P., Ho, K.Y., Ng, E.K.W., Debnam, E.S., Leung, P.S., 2012. Upregulation of ACE2-ANG-(1-7)-Mas axis in jejunal enterocytes of type 1 diabetic rats: implications for glucose transport. *AJP Endocrinol. Metab.* 303, 669–681.

- Wood, R.J., Tchack, L., Taparia, S., 2001. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases the expression of the CaT1 epithelial calcium channel in the Caco-2 human intestinal cell line. *BMC Physiol* 1, 11.
- Wu, J., Liao, W., Udenigwe, C.C., 2017. Revisiting the mechanisms of ACE inhibitory peptides from food proteins. *Trends Food Sci. Technol.* 69, 214–219.
- Wu, S., Qi, W., Li, T., Lu, D., Su, R., He, Z., 2013. Simultaneous production of multi-functional peptides by pancreatic hydrolysis of bovine casein in an enzymatic membrane reactor via combinational chromatography. *Food Chem.* 141, 2944–2951.
- Xu, G. qian, Chu, J., Wang, Y. hong, Zhuang, Y. ping, Zhang, S. Liang, Peng, H. Qiong, 2006. Development of a continuous cell-recycle fermentation system for production of lactic acid by *Lactobacillus paracasei*. *Process Biochem.* 41, 2458–2463.
- Xue, X., Hou, Z., Zhou, Y., Yu, Z., He, G., Luo, X., 2016. Activation of GLP-1 receptor promotes bone marrow stromal cell osteogenic differentiation through b-Catenin. *Stem Cell Reports* 6, 1–13.
- Yamamura, S., Morishima, H., Kumano-go, T., Suganuma, N., Matsumoto, H., Adachi, H., Sigedo, Y., Mikami, a, Kai, T., Masuyama, a, Takano, T., Sugita, Y., Takeda, M., 2009. The effect of *Lactobacillus helveticus* fermented milk on sleep and health perception in elderly subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.* 63, 100–105.
- Yan, K., Shen, Y., 2017. Aliskiren has chondroprotective efficacy in a rat model of osteoarthritis through suppression of the local renin-angiotensin system. *Mol. Med. Rep.* 16, 3965–3973.
- Yang, F., Xia, W.-S., Zhang, X.-W., Xu, Y.-S., Jiang, Q.-X., 2016. A comparison of endogenous and microbial proteolytic activities during fast fermentation of silver carp inoculated with *Lactobacillus plantarum*. *Food Chem.* 207, 86–92.
- Zeng, Z., Luo, J.Y., Zuo, F.L., Yu, R., Zhang, Y., Ma, H.Q., Chen, S.W., 2015. Bifidobacteria possess inhibitory activity against dipeptidyl peptidase DPP-IV. *Lett. Appl. Microbiol.*
- Zheng, Z., Liao, P., Luo, Y., Li, Z., 2013. Effects of fermentation by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, refrigeration and simulated gastrointestinal digestion on the antigenicity of four milk proteins. *J. Food Process. Preserv.* 38, 1106–1112.
- Zisman, L.S., 2005. ACE and ACE2: A tale of two enzymes. *Eur. Heart J.* 26, 322–324.

Valorisation scientifique

- Avant la soumission des publications, les souches d'intérêt ont été déposées en collection et un **brevet** sera déposé.

Approche probiotiques

- Une **publication** prête pour soumission (*Journal of Functional Foods* envisagé). Titre : Effect of probiotic Lactobacillus strains from Mongolia on calcium transport and uptake in intestinal cells Caco-2 and HT-29 MTX. Auteurs : Cyril Raveschot, François Coutte, Marc Frémont, Djamel Drider, Pascal Dhulster, Christophe Flahaut, Benoit Cudennec.

Approche peptides bioactifs

- Une **revue** dans *Frontiers in Microbiology*. Titre : Production of bioactive peptides by Lactobacillus species : from gene to application. Auteurs : Cyril Raveschot, Benoit Cudennec, François Coutte, Christophe Flahaut, Marc Frémont, Djamel Drider, Pascal Dhulster. Accepted on 13/09/18.
- Une **publication** prête pour soumission (*Food Chemistry* envisagé). Titre : Screening of Mongolian Lactobacillus strains for their proteolytic activity using multiparametric analysis of fermented cow milk. Auteurs : Cyril Raveschot, Benoit Cudennec, Barbara Deracinois, Marc Frémont, Maxime Vaeremans, Jamyan Dugersuren, Shirchin Demberel, Djamel Drider, Pascal Dhulster, François Coutte, Christophe Flahaut.
- Une **publication** prête pour soumission (*Bioresource Technology* envisagé). Titre : Integrated continuous process development for ACE inhibitory peptide production by Lactobacillus helveticus strains. Auteurs : Cyril Raveschot, Christophe Flahaut, Emmeline Bertrand, Barbara Deracinois, Marc Frémont, Djamel Drider, Pascal Dhulster, Benoit Cudennec, François Coutte.
- **Communication orale** aux Journées Jeunes Chercheurs Condorcet J2C2 en Janvier 2017. Titre : Stratégie de criblage d'une collection de Lactobacilles en vue de la sélection de souches protéolytiques. Auteurs : Cyril Raveschot, Benoit Cudennec, François Coutte, Barbara Deracinois, Christophe Flahaut, Marc Frémont, Djamel Drider, Pascal Dhulster.
- **Poster** au 21e colloque du club des bactéries lactiques (CBL) en Juin 2017. Titre : Multiparametric analysis of Lactobacillus proteolysis in milk, an original strategy to screen and select strains for bioactive peptides production. Auteurs : Cyril Raveschot, Benoit Cudennec, François Coutte, Barbara Deracinois, Christophe Flahaut, Marc Frémont, Djamel Drider, Pascal Dhulster.

Annexes

Annexe 1 : Liste des souches de la collection de Mongolie : origines, caractéristiques et résultats des criblages.
Cat : catalase, Gr : Gram, Y : yaourt, LF : lait fermenté.

Echantillon	Code	Cat.	Gr.	Morpho.	Espèce	Ø gélose lait (mm)	Rés. acidité	% hydrophobie
Désert de Gobi								
Y (chèvre)	1a	Neg	+	Bac	<i>L. delbrueckii</i>	29,0	0	0
LF (chamelle)	2b	Neg	+	Bac	<i>L. kefiranofaciens</i>	16,0	1	0
	2c	Neg	+	Bac Fil	<i>L. kefiranofaciens</i>	17,0	0	7,7
LF (jument)	3a	Neg	+	Bac Court	<i>L. kefiranofaciens</i>	8,3	1	7,1
	3b	Neg	+	Bac	<i>L. kefiranofaciens</i>	7,7	0	0
	3c	Neg	+	Bac Fil	<i>L. kefiranofaciens</i>	8,3	3	6,6
	3d	Neg	+	Bac Fil	<i>L. kefiranofaciens</i>	9,7	3	0
Y (vache)	4a	Neg	+	Bac	<i>L. acidophilus</i>	18,3	3	5,1
	4b	Neg	+	Coc	<i>P. pentosaceus</i>	13,7	3	0
Y (chèvre)	5a	Neg	+	Bac	<i>L. delbrueckii</i>	0,0	0	41,7
	5b	Neg	+	Coc	<i>S. thermophilus</i>	28,0	0	9,5
Y (chèvre)	6a	Neg	+	Bac	<i>L. delbrueckii</i>	27,7	0	0
LF (chamelle)	7a	Neg	+	Bac Fil	<i>L. kefiranofaciens</i>	12,7	3	4,1
	7b	Neg	+	Bac Fil	<i>L. kefiri</i>	19,0	3	15,1
	7c	Neg	+	Bac	<i>L. kefiranofaciens</i>	0,0	0	6,8
	7d	Neg	+	Bac Court	<i>L. kefiri</i>	21,0	3	15,2
LF (chamelle)	9a	Neg	+	Bac	<i>L. kefiranofaciens</i>	26,7	0	2,3
	9b	Neg	+	Bac Court	<i>L. casei</i>	23,0	3	69,1
	9c	Neg	+	Bac Fil	<i>L. kefiranofaciens</i>	12,3	0	40,4
	9d	Neg	+	Bac	<i>L. kefiranofaciens</i>	8,3	0	12,2
	9e	Neg	+	Bac	<i>L. kefiranofaciens</i>	16,0	1	14,8
LF (jument)	10a	Neg	+	Bac	<i>L. kefiranofaciens</i>	19,7	0	15,2
	10c	Neg	+	Bac	<i>L. kefiranofaciens</i>	20,7	0	13,7
Y (vache)	11a	Neg	+	Bac	<i>L. kefiranofaciens</i>	0,0	3	0
	11b	Neg	+	Bac	<i>L. kefiranofaciens</i>	0,0	1	66,7
LF (chamelle)	12a	Neg	+	Bac	<i>L. kefiranofaciens</i>	0,0	1	0
	12b	Neg	+	Bac	<i>L. kefiranofaciens</i>	21,0	3	0
	12c	Neg	+	Bac	<i>L. kefiri</i>	0,0	3	4,0
LF (jument)	13a	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	24,0	3	6,6
	13b	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	22,3	0	6,2
LF (jument)	14b	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	19,0	3	5,2
	14c	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	18,7	0	0
LF (chamelle)	15a	Neg	+	Bac	<i>L. kefiranofaciens</i>	21,0	0	16,1
	15b	Neg	+	Bac Fil	<i>L. kefiranofaciens</i>	18,0	3	60,0
	15c	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	19,7	3	15,4
LF (jument)	16a	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	15,0	3	12,6
	16b	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	31,3	2	0,7

Echantillon	Code	Cat.	Gr.	Morpho.	Espèce	Ø gélose lait (mm)	Rés. acidité	% hydrophobie
LF (jument)	17a	Neg	+	Coc	<i>Lactococcus lactis</i>	0,0	0	25,4
	17b	Neg	+	Coc	<i>Lactococcus lactis</i>	17,7	0	17,2

Région de l'Hangai

LF (jument)	18a	Neg	+	Bac	<i>L. delbrueckii</i>	21,7	0	6,3
	18b	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	28,3	2	0
	18c	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	15,3	0	4,0
	18d	Neg	+	Bac	<i>L. kefir</i>	0,0	3	41,4
LF (jument)	19a	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	21,3	0	33,7
	19b	Neg	+	Bac	<i>L. kefirano-faciens</i>	6,7	0	9,4
LF (jument)	20b	Neg	+	Bac	<i>L. kefirano-faciens</i>	21,0	0	19,4
	20c	Neg	+	Bac	<i>L. kefirano-faciens</i>	31,0	0	14,2
Y (vache)	21c	Neg	+	Bac Fil	<i>L. delbrueckii</i>	34,0	0	20,4
	21d	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	25,7	2	0
LF (jument)	22a	Neg	+	Bac Court	<i>L. helveticus</i>	17,0	1	17,0
	22b	Neg	+	Bac Court	<i>L. helveticus</i>	30,7	2	10,5
Y (vache)	23b	Neg	+	Bac	<i>L. delbrueckii</i>	32,7	0	22,2
LF (jument)	24a	Neg	+	Bac Court	<i>L. helveticus</i>	24,7	2	13,4
LF (jument)	25a	Neg	+	Bac	<i>L. kefirano-faciens</i>	17,0	0	13,0
	25b	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	31,7	3	22,6
	25c	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	32,3	2	7,9
LF (jument)	26a	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	31,7	0	28,5
Y (vache)	27a	Neg	+	Bac	<i>L. kefirano-faciens</i>	13,7	3	15,2
	27b	Neg	+	Bac Fil	<i>L. delbrueckii</i>	32,7	0	29,8
	27c	Neg	+	Bac Fil	<i>L. delbrueckii</i>	28,0	0	25,3
LF (jument)	28a	Neg	+	Bac	<i>L. kefirano-faciens</i>	26,7	1	9,3
	28b	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	25,3	0	10,7
	28c	Neg	+	Bac	<i>L. kefirano-faciens</i>	26,3	0	11,7
	28d	Neg	+	Bac Court	<i>L. kefirano-faciens</i>	24,3	2	36,6
Y (vache)	29c	Neg	+	Coc	<i>S. thermophilus</i>	22,3	0	23,9

Echantillon	Code	Cat.	Gr.	Morpho.	Espèce	Ø gélose lait (mm)	Rés. acidité	% hydrophobie
<i>Chaines de l'Altai</i>								
Y (vache)	30a	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	33,3	0	0
	30b	Neg	+	Bac	<i>L. fermentum</i>	22,7	3	4,7
LF (jument)	31a	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	31,7	0	1,7
	31b	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	20,3	0	0
	31c	Neg	+	Bac	<i>L. plantarum</i>	18,7	3	21,2
	31d	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	19,7	1	36,4
	31e	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	19,7	0	21,8
LF (jument)	32a	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	30,7	3	18,9
	32b	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	28,3	1	12,0
	32c	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	22,7	0	7,8
	32d	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	20,0	0	0
	32e	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	24,7	0	17,3
Y (vache)	33a	Neg	+	Bac	<i>L. fermentum</i>	13,7	3	27,1
	33c	Neg	+	Bac	<i>L. delbrueckii</i>	31,7	0	14,1
LF (jument)	34a	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	20,3	2	29,5
	34b	Neg	+	Bac	<i>L. delbrueckii</i>	39,0	0	3,6
	34c	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	18,3	3	2,1
Y (yak)	35a	Neg	+	Bac	<i>L. plantarum</i>	18,3	3	0
	35b	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	20,7	1	2,3
	35c	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	23,3	0	0
LF (yak)	36a	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	23,0	3	0
	36b	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	15,3	2	5,8
LF (jument)	37a	Neg	+	Bac	<i>L. plantarum</i>	16,7	3	0,7
	37b	Neg	+	Bac	<i>L. delbrueckii</i>	19,7	0	6,5
	37c	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	13,7	2	5,6
Y (vache/yak)	38a	Neg	+	Bac	<i>L. fermentum</i>	16,0	3	7,1
LF (jument)	39a	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	17,7	1	0,6
	39b	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	15,7	1	0
	39c	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	23,7	0	0
Y (vache/yak)	40b	Neg	+	Bac	<i>L. delbrueckii</i>	23,7	0	3,4
	40c	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	18,3	3	5,7
LF (jument)	41a	Neg	+	Bac	<i>L. casei</i>	21,7	2	20,6
	41b	Neg	+	Coc	<i>Lactococcus lactis</i>	13,7	0	8,5
	41c	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	8,7	3	6,3
	41e	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	12,7	0	0
LF (jument)	42a	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	8,3	1	9,2
	42b	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	20,0	0	8,4
	42c	Neg	+	Bac Court	<i>Leuconostoc lactis</i>	0,0	0	0
Y (vache)	43a	Neg	+	Bac	<i>L. delbrueckii</i>	28,0	0	2,5
	43b	Neg	+	Bac	<i>Leuconostoc lactis</i>	9,3	2	24,6
LF (jument)	44a	Neg	+	Bac	<i>L. delbrueckii</i>	26,7	1	11,5

Echantillon	Code	Cat.	Gr.	Morpho.	Espèce	Ø gélose lait (mm)	Rés. acidité	% hydrophobie
	44b	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	17,0	0	14,6
	44c	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	23,7	0	37,9
	44d	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	11,0	0	24,0
Y (vache/yak)	45a	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	32,0	0	25,8
	45b	Neg	+	Bac	<i>L. delbrueckii</i>	12,7	0	8,8
Y (vache/yak)	45c	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	24,0	3	18,5
	45d	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	33,7	0	28,3
Y (Hainakh)	46a	Neg	+	Bac	<i>L. plantarum</i>	17,3	3	32,0
	46b	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	35,0	0	27,7
LF (chamelle)	47a	Neg	+	Bac	<i>L. fermentum</i>	14,7	3	2,4
	47b	Neg	+	Bac	<i>L. plantarum</i>	17,7	3	7,4
	47c	Neg	+	Bac	<i>Leuconostoc lactis</i>	7,7	0	74,2
	47d	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	32,0	2	5,5
Y (vache)	48a	Neg	+	Bac	<i>L. fermentum</i>	13,0	3	61,0
	48b	Neg	+	Bac	<i>L. delbrueckii</i>	30,0	1	15,3
	48c	Neg	+	Bac	<i>L. delbrueckii</i>	0,0	0	9,3
	48d	Neg	+	Bac	<i>L. delbrueckii</i>	24,0	0	17,8
	48e	Neg	+	Bac Fil	<i>L. delbrueckii</i>	0,0	0	66,0
LF (jument)	49a	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	8,3	1	11,4
	49b	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	22,3	0	19,9
	49c	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	19,7	1	0
	49d	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	35,0	3	42,4
Y (yak)	50a	Neg	+	Bac	<i>L. delbrueckii</i>	33,0	0	0
	50b	Neg	+	Bac	<i>L. delbrueckii</i>	29,7	0	36,3
LF (jument)	51a	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	14,3	1	0,4
	51b	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	20,3	1	7,7
	51c	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	31,7	2	19,3
Y (yak)	52a	Neg	+	Bac	<i>L. fermentum</i>	10,3	3	23,4
	52b	Neg	+	Bac	<i>L. delbrueckii</i>	25,0	0	10,4
Y (yak)	53b	Neg	+	Bac	<i>L. delbrueckii</i>	31,3	0	3,8
Y (yak)	54a	Neg	+	Bac	<i>L. delbrueckii</i>	28,3	0	20,7
	54b	Neg	+	Bac	<i>L. delbrueckii</i>	0,0	0	20,6
LF (jument)	55a	Neg	+	Bac Court	<i>L. plantarum</i>	24,0	3	32,5
	55b	Neg	+	Bac	<i>Leuconostoc lactis</i>	17,7	0	24,5
	55c	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	16,7	3	3,1
	55d	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	19,0	3	0
Y (yak)	56a	Neg	+	Bac	<i>L. delbrueckii</i>	28,3	0	48,9
	56b	Neg	+	Bac	<i>L. delbrueckii</i>	26,0	0	8,7
Y (vache)	57a	Neg	+	Bac	<i>L. delbrueckii</i>	29,0	0	10,7
	57b	Neg	+	Bac	<i>L. delbrueckii</i>	22,3	1	18,7
	57c	Neg	+	Bac	<i>L. delbrueckii</i>	27,7	0	7,7
LF (jument)	58a	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	32,3	1	37,9
	58b	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	37,0	0	16,1

Echantillon	Code	Cat.	Gr.	Morpho.	Espèce	Ø gélose lait (mm)	Rés. acidité	% hydrophobie
Y (yak)	59a	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	12,7	0	25,6
	59b	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	27,3	1	8,3
	59c	Neg	+	Bac	<i>L. delbrueckii</i>	27,3	0	16,2
LF (jument)	60b	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	35,0	1	1,8
	60c	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	22,3	1	19,2
Y (vache)	62a	Neg	+	Bac	<i>L. fermentum</i>	11,3	3	26,0
	62b	Neg	+	Bac	<i>L. fermentum</i>	22,0	3	29,2
	62c	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	27,7	1	0
Y (yak)	63a	Neg	+	Bac	<i>L. delbrueckii</i>	30,0	0	8,3
Y (yak)	63b	Neg	+	Bac	<i>L. delbrueckii</i>	31,0	0	6,7
	63c	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	22,3	0	11,0
	63d	Neg	+	Bac	<i>L. delbrueckii</i>	27,0	0	0
	63e	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	25,7	0	0
Y (yak)	64a	Neg	+	Bac	<i>L. delbrueckii</i>	29,7	2	3,7
	64b	Neg	+	Bac	<i>L. delbrueckii</i>	24,7	1	2,9
	64c	Neg	+	Coc	<i>S. thermophilus</i>	26,7	0	0
Y (yak)	65a	Neg	+	Bac	<i>L. delbrueckii</i>	26,3	0	8,0
	65b	Neg	+	Bac	<i>L. delbrueckii</i>	27,0	1	3,6
Y (yak)	66b	Neg	+	Bac	<i>L. delbrueckii</i>	31,0	1	1,0
Y (vache)	67a	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	31,0	1	19,4
	67b	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	31,0	2	7,4
LF (jument)	68a	Neg	+	Bac	<i>L. kefiranoferiens</i>	31,3	0	2,6
	68b	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	24,3	0	21,8
Y (chèvre)	69a	Neg	+	Bac	<i>L. helveticus</i>	14,7	3	0
	69b	Neg	+	Bac	<i>L. fermentum</i>	19,0	3	15,5

Annexe 2 : Listes des séquences peptidiques identifiées par LC-MS/MS dans les produits fermentés avant et après DGI.

Pour chaque produit, seules les séquences communes aux trois réplicats de DGI sont représentées. Chaque séquence est associée à sa protéine d'origine (ou numéro d'accèsion Uniprot), son rapport masse/charge (m/z) et son score d'identification (-10logP). Les IC₅₀ prédites par les modèles QSAR sont présentées et la présence d'un peptide dans la base de données MBPDB est reportée. β-LGB : β-lactoglobuline, ACEi : inhibiteur de l'ACE, DPP-IVi : inhibiteur de la DPP-IV, IM : immunomodulateur, AM : antimicrobien, AOx : antioxydant et CPP : phosphopeptide de caséine.

Protéine	Séquence	m/z	-10logP	ACE	DPPIV	MBPDB
				IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	
F Ctl Brut						
Caséine β	GPFPIIV	742,4	33,9	866,0	2346,1	
	KVKEAMAPK	1001,6	49,0	422,2	1164,8	
	MPIQAFLLYQEPVLGPVRGPFPIIV	932,2	44,4	866,0	478,4	
	PVLGPVRGPFPIIV	731,0	53,0	866,0	1966,2	
	QEPVLGPVRGPFPIIV	859,5	44,4	866,0	3076,5	ACEi
	RELEELNVPGEIVESL	913,5	57,9	91,9	3497,6	
	RELEELNVPGEIVESLSSEESITR	934,8	51,5	373,8	3246,9	CPP
	RELEELNVPGEIVESLSSEESITRIN	1010,5	40,9	55,6	2903,6	
	SLVYPFPGPIPN	650,8	39,2	18,7	573,9	
	YQEPVLGPVRGPFPIIV	941,0	74,2	866,0	1730,8	ACEi, IM, AM
Caséine αs1	APFPEVF	806,4	46,4	87,5	1628,4	
	APFPEVFG	863,4	45,3	1492,1	888,0	
	APSFSDIPNPIGSEN	772,9	36,2	20,1	476,6	
	APSFSDIPNPIGSENSEK	944,9	41,3	453,6	672,0	
	FVAPFPEVFGK	619,3	40,2	91,9	-124,3	
	HIQKEDVPSERYLGYLEQLRLK	707,6	50,9	1412,2	577,9	AM
	IPNPIGSENSEK	642,8	34,5	453,6	-383,2	
	IPNPIGSENSEKTTMPLW	1015,5	46,3	72,5	796,9	
	IPNPIGSENSEKTTMPLW	1007,5	57,7	72,5	796,9	
	NPIGSENSEKTTMPLW	902,4	51,0	72,5	2205,8	
	PIGSEN	616,3	34,2	20,1	980,9	
	PIGSENSEKTTMPLW	853,4	52,9	72,5	2356,4	
	SEKTTMPLW	1092,5	56,7	72,5	3527,1	
	SFSDIPNPIGSENSEK	860,9	37,2	453,6	945,5	
	VPQLEIVPNSAEERLHSM	683,7	53,4	65,9	912,2	
G3N0E4	PLGSEN	616,3	34,2	20,1	1020,2	
J9UHS4	SLVYPFPGPIHN	670,9	56,5	20,5	577,6	
K9ZSD8	EVIESPPEINTVQVTST	922,0	55,9	35,9	1280,8	
	PEVIESPPEINTVQVTSTAV	1055,5	53,7	266,3	3728,2	
	TVQVTSTAV	905,5	49,5	266,3	1313,3	
	VIESPPEINTVQVTSTAV	942,5	44,4	266,3	819,2	

Protéine	Séquence	m/z	-10logP	ACE	DPPIV	MBPDB	
				IC ₅₀ (µM)	IC ₅₀ (µM)		
F 45a Brut							
Caséine β	DELQDKIHPF	621,3	53,6	44,6	3144,1	ACEi	
	DKIHPF	756,4	31,9	44,6	3637,5		
	DMPIQAF	821,4	47,0	40,7	2389,7		
	DVENLHLPLPL	630,4	45,9	160,3	1408,4		
	DVENLHLPLPLLQ	750,9	51,5	111,4	1390,1		
	EDELQDKIHPF	685,8	64,2	44,6	3019,1		
	EEQQQTEDELQDKIHPF	705,3	54,1	44,6	3111,6		
	ELEEL	632,3	28,7	172,3	1143,3		
	EQQQTEDELQDKIHPF	662,3	46,3	44,6	2783,2		
	LLYQEPVLGPVRGPFP	891,5	72,3	109,9	304,9		
	LLYQEPVLGPVRGPFPIIV	1054,1	54,2	866,0	278,7		ACEi
	LPVPQKAVPYPQ	668,9	31,6	33,3	5,6		
	LTDVEN	690,3	33,4	20,1	217,5		
	LYQEPVLGPVRGPFP	835,0	61,6	109,9	1352,0		
	LYQEPVLGPVRGPFPIIV	997,6	55,3	866,0	1325,8		
	QDKIHPF	884,5	34,1	44,6	2966,4		
	QEPVLGPVRGPFP	696,9	47,5	109,9	3102,7		
	QEPVLGPVRGPFPIIV	859,5	42,8	866,0	3076,5	ACEi	
	QQQTEDELQDKIHPF	619,3	42,5	44,6	2730,5		
	QQTEDELQDKIHPF	864,4	49,0	44,6	2730,5		
	QTEDELQDKIHPF	800,4	51,7	44,6	2133,3		
	SEEQQQTEDELQ	732,3	36,8	111,4	2801,8		
	SEEQQQTEDELQD	789,8	43,1	25,9	2046,0		
	SEEQQQTEDELQDK	853,9	60,0	1540,3	2543,2		
	SEEQQQTEDELQDKIHPF	856,6	78,1	44,6	2968,5		
	TEDELQDKI	545,8	36,9	923,2	2093,5		
	TEDELQDKIHPF	736,4	65,2	44,6	2708,4		AM
	TESQSLTLT	979,5	34,5	209,7	2347,9		
	TLTDVE	677,3	33,3	241,0	743,0		
	VLPVPQKAVPYPQ	718,4	44,0	33,3	235,0		
	YQEPVLGPVRGPFP	778,4	64,8	109,9	1757,1		
	YQEPVLGPVRGPFPIIV	941,0	60,0	866,0	1730,8		
Caséine αs1	DIKQM	634,3	29,5	53,5	975,3		
	DIPNPIGSE	941,5	47,3	70,5	1186,0		
	DQAMEDIKQME	669,3	44,4	308,8	2428,9		
	EEIVPN	700,4	31,5	18,7	2415,9		
	FVAPFPE	806,4	41,6	123,0	-497,5		
	LDAYPS	665,3	28,5	133,0	1109,2		
	LDAYPSG	722,3	36,5	209,0	1806,4		
	QLDAYPS	793,4	35,6	133,0	601,7		

Protéine	Séquence	m/z	-10logP	ACE	DPPIV	MBPDB
				IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	
Caséine αs1	SEEIVPN	787,4	39,5	18,7	2272,8	
	SSEEIVPN	874,4	34,7	18,7	1363,4	
	STEDQAMEDIK	633,8	37,4	1252,9	1877,3	
	STEDQAMEDIKQM	763,3	45,0	53,5	1612,2	
	STEDQAMEDIKQME	827,8	46,0	308,8	1656,1	
	STEDQAMEDIKQMEAE	927,9	42,4	112,3	1950,9	
	TEDQAMEDIKQM	719,8	42,9	53,5	2277,6	
	TEDQAMEDIKQME	784,3	49,8	308,8	2321,6	
	VAPFPE	659,3	31,9	123,0	525,7	
	VAPFPEVF	905,5	50,3	87,5	1462,1	
A0A140T8A9	IESPPEIN	898,4	42,5	55,6	1400,6	
E1BG60	ELEEI	632,3	28,7	201,5	1086,0	
E1BPK9	HALPPT	635,3	29,0	62,7	689,1	
F1MHU9	HAIPPT	635,3	29,0	62,7	689,1	
G3X7X8	EIEEI	632,3	28,7	201,5	1046,8	
J9UHS4	HNSLPQ	695,3	30,5	33,3	1901,0	
Q0VCZ5	DLKQM	634,3	29,5	53,5	1014,5	
Q58D04	EIEEL	632,3	28,7	172,3	1104,0	

Protéine	Séquence	m/z	-10logP	ACE	DPPIV	MBPDB
				IC ₅₀ (µM)	IC ₅₀ (µM)	
F 49d Brut						
Caséine β	DELQDKIHPF	621,3	52,8	44,6	3144,1	
	DKIHPF	756,4	33,9	44,6	3637,5	ACEi
	DVENLHLPLPLLQ	750,9	36,5	111,4	1390,1	
	EAMAPK	646,3	35,2	422,2	1373,5	AM
	ELEEL	632,3	25,7	172,3	1143,3	
	ELNVPGE	757,4	31,5	26,8	1083,5	
	ELNVPGEIVE	1098,6	41,5	241,0	1146,3	
	ELQDKIHPF	563,8	39,2	44,6	1412,7	
	EMPFPKYPVEPFTES	899,4	41,6	143,0	968,3	
	EMPFPKYPVEPFTESQ	963,5	54,0	19,1	1798,1	
	EPVLGPVRGPFPIIV	795,5	42,7	866,0	1605,9	
	FLLYQEPVLGPVRGPFPIIV	1127,7	52,1	866,0	9,9	
	FLQPEVM	863,4	44,0	225,1	16,4	
	FPGPIP	741,4	35,6	18,7	-527,8	DPP-IVi
	FPKYPVEPFTESQ	784,9	52,8	19,1	118,2	
	HKEMPFPKYPVEPF	776,5	48,6	44,6	3045,2	
	HKEMPFPKYPVEPFTESQ	974,4	46,2	19,1	2995,5	
	HLPLPL	689,4	27,9	160,3	704,6	
	IPPLTQ	668,4	30,1	32,8	100,8	
	KAVPYPQ	802,4	45,3	33,3	1583,5	
	KVKEAM	705,4	28,6	104,9	1863,6	
	KVLPVPQ	780,5	25,7	33,3	1234,0	ACEi
	LLYQEPVL	974,6	42,2	314,1	447,7	
	LLYQEPVLGPVRGPF	891,5	68,3	109,9	304,9	
	LLYQEPVLGPVRGPFPIIV	1054,1	68,3	866,0	278,7	ACEi
	LQPEVM	716,4	32,0	225,1	1655,6	
	LVYFPGPIP	607,3	49,3	18,7	-323,1	
	LVYFPGPIPNSLPQN	877,0	34,4	8,7	-442,8	ACEi
	LYQEPVL	861,5	29,8	314,1	1494,8	
	LYQEPVLGPVRGPF	835,0	60,0	109,9	1352,0	
	LYQEPVLGPVRGPFPIIV	997,6	51,7	866,0	1325,8	
	MPFPKYPVEPFTE	791,4	34,1	121,3	153,1	
	MPFPKYPVEPFTESQ	898,9	44,5	19,1	411,2	
	NIPPLTQ	782,4	48,6	32,8	1294,9	
	NIPPLTQTPV	1079,6	45,4	291,8	1115,2	ACEi
	NIPPLTQTPVVVPPF	810,0	38,7	44,6	1432,3	
	NLHLPLPL	916,6	43,6	160,3	1323,2	
	NVPGEIVE	856,4	34,3	241,0	1316,7	
	NVPGEIVESL	1056,6	27,5	91,9	1816,2	
	PFPGPIP	838,4	37,8	18,7	1438,7	

Protéine	Séquence	m/z	-10logP	ACE	DPPIV	MBPDB
				IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	
Caséine β	PGEIVE	643,3	26,6	241,0	1918,6	
	PGPIP	594,3	23,8	18,7	1489,4	IM
	PKYPVEPF	976,5	40,5	44,6	4029,3	
	PKYPVEPFESQ	711,3	43,0	19,1	3979,6	
	PPLTQ	555,3	24,1	32,8	1875,2	
	QEPVLGPVRGPFPIIV	859,5	51,7	866,0	3076,5	ACEi
	SLSQSKVLPVPQKAVPYPQ	689,4	32,5	33,3	838,5	
	SLTLTD	649,3	25,9	55,0	760,5	
	SLVYPF	725,4	32,0	44,6	1269,6	
	SLVYPFPGPIP	650,8	61,1	18,7	573,9	
	SLVYPFPGPIPNSLPQN	920,5	34,8	8,7	454,2	
	SVLSLS	605,4	22,8	445,0	887,3	
	TEDELQDKIHPF	736,4	47,7	44,6	2708,4	AM
	TESQSL	664,3	28,8	91,9	2941,4	
	TLTDVE	677,3	31,5	241,0	743,0	
	TLTDVEN	791,4	34,8	20,1	192,6	
	TLTDVENL	904,5	36,7	33,5	902,1	
	TPVVVPFL	968,6	44,2	656,1	1073,8	
	TPVVVPFLQP	597,3	36,4	12,5	1072,1	ACEi
	TPVVVPFLQPE	661,9	59,4	123,0	583,7	
	TPVVVPFLQPEVM	776,9	80,8	225,1	1209,1	
	TPVVVPFLQPEVM	784,9	73,1	225,1	1209,1	
	TPVVVPFLQPEVMG	805,4	60,1	915,2	957,3	
	TPVVVPFLQPEVMG	813,4	41,9	915,2	957,3	
	TPVVVPFLQPEVMGV	855,0	58,0	63,5	1140,1	
	TPVVVPFLQPEVMGV	863,0	53,6	63,5	1140,1	
	TPVVVPFLQPEVMGVS	898,5	73,9	260,7	761,7	
	TPVVVPFLQPEVMGVS	906,5	64,9	260,7	761,7	
	TPVVVPFLQPEVMGVSKVK	717,7	46,2	827,2	1019,7	
	TPVVVPFLQPEVMGVSKVKE	760,8	45,4	605,8	174,4	
	TPVVVPFLQPEVMGVSKVKEA	784,4	48,6	161,9	321,9	
	TPVVVPFLQPEVMGVSKVKEAMAP	884,2	27,8	24,5	1701,3	
	TPVVVPFLQPEVMGVSKVKEAMAPK	695,4	51,3	422,2	684,8	
	TQTPVVVPFLQPEVM	891,5	26,5	225,1	2404,0	
	VPGEIVE	742,4	27,8	241,0	575,2	DPP-IVi
	VPPFLQPE	926,5	30,8	123,0	240,3	
	VVPPFLQPEVM	628,3	33,3	225,1	801,7	
	VVVPF	657,4	30,3	44,6	777,6	
	VVVPFL	770,5	30,6	656,1	666,3	
	VVVPFLQPEVM	677,9	40,1	225,1	801,7	
	VVVPFLQPEVMG	706,4	32,0	915,2	549,8	

Protéine	Séquence	m/z	-10logP	ACE	DPPIV	MBPDB
				IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	
Caséine β	VVVPFLQPEVMGV	755,9	40,9	63,5	732,7	
	VVVPFLQPEVMGVS	807,4	27,6	260,7	354,3	
	VYFPFGPIPN	917,3	62,7	18,7	1017,5	ACEi, AOx
	VYFPFGPIPNSLPQN	820,4	29,1	8,7	897,7	
	YFPFGPIPN	1001,5	48,6	18,7	-177,4	ACEi, DPP-IVi
	YPVEPF	751,4	29,3	44,6	518,3	DPP-IVi
	YQEPVL	748,4	29,8	314,1	1899,9	ACEi
	YQEPVLGPVRGPFP	778,4	55,5	109,9	1757,1	
	YQEPVLGPVRGPFPIV	941,0	62,2	866,0	1730,8	ACEi, IM, AM
Caséine αs1	DIKQM	634,3	26,3	53,5	975,3	
	DIPNPIGSE	941,5	38,6	70,5	1186,0	
	DIPNPIGSENSE	848,1	46,5	70,5	1186,0	
	DIPNPIGSENSEK	700,3	59,1	453,6	784,5	
	DIPNPIGSENSEKTTMP	915,4	28,1	67,4	1627,4	
	EDIKQM	763,4	27,7	53,5	2588,4	
	EMPFPKYYPEPFTE	855,9	51,7	121,3	1540,0	
	EVLNEN	717,3	26,8	20,1	707,4	
	EVLNENL	830,4	26,6	33,5	1416,9	
	EVLNENLL	943,5	26,5	536,3	1640,4	
	EVLNENLLRF	623,8	28,8	333,8	865,0	
	EVLNENLLRFF	697,4	37,6	182,7	1561,3	
	FFVAPFPE	953,5	50,7	123,0	-311,7	
	FSDIPNPIGSENSEK	817,4	60,8	453,6	160,4	
	FSDIPNPIGSENSEKTTMP	1032,5	37,0	67,4	1003,3	
	FVAPFPE	806,4	39,1	123,0	-497,5	
	FVAPFPEVF	1052,5	56,9	87,5	438,8	
	GKEKVNEL	916,5	31,7	172,3	4075,7	
	GYLEQL	722,4	32,6	74,6	2931,9	
	GYLEQLL	835,5	28,2	536,3	3316,1	
	HQGLPQ	679,4	33,2	33,3	1792,3	
	HQGLPQE	808,4	35,8	57,2	1502,3	
	HQGLPQEVLENLL	802,4	33,7	536,3	2339,6	
	IGVNQEL	772,4	29,6	172,3	141,3	
	KHQGLPQ	807,5	39,1	33,3	2369,2	
	KHQGLPQE	936,5	31,5	57,2	2079,2	
	KHQGLPQEVL	574,8	33,7	314,1	2987,0	
	KYKVPQLEIVPN	714,4	28,2	18,7	1904,9	
	LEIVPN	684,4	27,5	18,7	1264,3	
	LLRFFVAPFPE	668,4	33,5	123,0	-340,3	
	LRFFVAPFPE	611,8	29,0	123,0	2095,2	
	RPKHPI	747,5	27,3	187,5	1535,7	ACEi

Protéine	Séquence	m/z	-10logP	ACE	DPPIV	MBPDB
				IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	
Caséine αs1	SDIPNPIGSENSE	679,8	24,5	70,5	2656,0	AM
	SDIPNPIGSENSEK	743,9	54,1	453,6	2254,5	
	SDIPNPIGSENSEKTTMPLW	1108,5	37,2	72,5	3434,6	
	SFSDIPNPIGSENSEK	860,9	40,5	453,6	945,5	
	SFSDIPNPIGSENSEKTTMP	1076,0	36,2	67,4	1788,5	
	TDAPSFS	724,3	34,3	544,5	1894,6	ACEi, AM
	TTMPLW	748,4	25,2	72,5	2341,4	
	VAPFPE	659,3	36,7	123,0	525,7	
	VAPFPEVF	905,5	48,6	87,5	1462,1	
	VFGKEKVNEL	775,4	35,7	172,3	694,0	
	YLEQL	665,3	21,3	74,6	74,6	
	YTDAPS	653,3	34,2	133,0	357,7	
	YTDAPSFS	887,4	45,8	544,5	394,7	
Caséine αs2	AVPITPT	698,4	25,7	62,7	604,5	
	AVPITPTLN	925,5	46,0	62,7	798,2	
	KNTME	622,3	23,7	308,8	2645,9	
	NAVITPT	812,4	41,5	62,7	1307,7	
A0A0M3R7C5	TIASGEPTSTPTTE	696,3	37,6	121,3	662,5	
A6QNW3	DAAGGPGAPADPGRPT	703,8	39,2	62,7	1281,3	
AGQNW3	ALLDPS	615,3	23,0	133,0	359,6	
E1B7K5	YIEQL	665,3	21,3	74,6	35,4	
E1BC95	LPPITQ	668,4	30,1	32,8	299,2	
	NLPPITQ	782,4	48,6	32,8	1334,1	
E1BD39	EIEEL	632,3	25,7	172,3	1104,0	
E1BE87	DLKQM	634,3	26,3	53,5	1014,5	
	EDLKQM	763,4	27,7	53,5	2588,4	
E1BEB3	GYLEQI	722,4	32,6	87,2	2874,6	
	YLEQI	665,3	21,3	87,2	17,4	
E1BGJ9	PPITQ	555,3	24,1	32,8	1875,2	
E7E1Q1	AVESTV	605,3	31,0	287,7	1205,9	
	AVESTVATL	890,5	39,3	158,1	1374,7	
	DKTEIPTIN	1030,5	38,9	55,6	3276,5	
	EIPTIN	686,4	30,3	55,6	1012,5	
	QVTSTAV	705,4	26,8	266,3	1663,8	
	SPPEIN	656,3	37,6	55,6	1084,2	
	STVATLE	720,4	26,8	411,5	1705,9	
	TIASGEPT	775,4	28,8	62,7	345,3	
	TIASGEPTSTPTIE	702,3	24,4	365,1	703,5	
	TLEASPE	746,4	31,3	123,0	408,1	
	TVQVTSTAV	905,5	48,9	266,3	1313,3	
	VIESPPEIN	997,5	49,1	55,6	265,9	

Protéine	Séquence	m/z	-10logP	ACE	DPPIV	MBPDB
				IC ₅₀ (µM)	IC ₅₀ (µM)	
E7E1Q1	VIESPPEINTVQ	663,4	53,4	65,3	530,7	
	VIESPPEINTVQVT	763,4	32,5	122,8	336,9	
	VIESPPEINTVQVTSTAV	837,9	28,9	266,3	819,2	
	VTSTAV	577,3	26,0	266,3	1631,7	
EPYC	HIPLPL	689,4	27,9	160,3	665,4	
F1MF93	ELEEI	632,3	25,7	201,5	1086,0	
F1N0A6	EIEEI	632,3	25,7	201,5	1046,8	
G3MZC0	ELPTLN	686,4	30,3	62,7	981,5	
GLCM1	ILNKPEDETHLE	719,4	36,6	411,5	-274,3	
J9UHS4	LVYFPFGPIHN	627,3	41,7	20,5	-319,4	
	LVYFPFGPIHNSLPQ	840,0	37,1	33,3	-58,5	
	LVYFPFGPIHNSLPQN	897,0	37,7	8,7	-442,8	
	SLVYFPFGPIH	613,8	28,1	144,4	1109,5	
	SLVYFPFGPIHN	670,9	57,9	20,5	577,6	
	SLVYFPFGPIHNSLPQ	785,4	52,1	33,3	838,5	
	SLVYFPFGPIHNSLPQN	940,5	50,3	8,7	454,2	
	VYFPFGPIHN	760,7	50,6	20,5	1021,2	
	VYFPFGPIHNSLPQ	783,4	40,6	33,3	1282,1	
	YFPFGPIHNSLPQ	733,9	42,4	33,3	87,2	

F 60b Brut

Caséine β	APKHKEMPFKYPVEPF	681,4	50,8	44,6	1293,5	
	DELQDKIHPF	621,3	43,3	44,6	3144,1	
	DELQDKIHPFAQTQ	835,4	46,5	32,8	3006,6	
	DMPQA	674,3	40,7	70,1	1018,5	
	EPVLGPVRGPF	632,9	51,4	109,9	1632,2	ACEi
	EPVLGPVRGPFPIIV	795,5	42,0	866,0	1605,9	
	FPKYPVEPF	1123,6	57,4	44,6	167,9	
	LLYQEPVLGPVRGPFPIIV	1054,1	43,5	866,0	278,7	ACEi
	NVPGEIVE	856,4	37,8	241,0	1316,7	
	QEPVLGPVRGPFPIIV	859,5	41,6	866,0	3076,5	ACEi
	QQQTEDELQ	1118,5	50,9	111,4	2563,8	
	QSEEQQTEDELQ	796,3	39,3	111,4	1982,8	
	SEEQQTEDELQ	732,3	49,4	111,4	2801,8	
	SLTLTDVE	877,5	39,4	241,0	1003,2	

Protéine	Séquence	m/z	-10logP	ACE	DPPIV	MBPDB
				IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	
Caséine β	SVLSLSQS	820,4	33,7	61,9	503,1	
	TEDELQDKIHPF	736,4	44,8	44,6	2708,4	AM
	TLTDVEN	791,4	39,8	20,1	192,6	
	TPVVVPFLQPEVM	776,9	54,4	225,1	1209,1	
	YPFPGPIPN	1001,5	51,4	18,7	-177,4	ACEi, DPP-IVi
	YQEPVLGPVRGPFPIIV	941,0	52,2	866,0	1730,8	ACEi, IM, AM
Caséine αs1	DIPNPIGSE	941,5	43,1	70,5	1186,0	
	EDIKQMEAE	1092,5	41,9	112,3	2927,1	
	FSDIPNPIGSENSEKTTMP	1032,5	41,5	67,4	1003,3	
	FVAPFPE	806,4	39,1	123,0	-497,5	
	FVAPFPEVF	1052,6	57,7	87,5	438,8	
	SDIPNPIGSENSEK	743,9	50,2	453,6	2254,5	AM
	SDIPNPIGSENSEKTTMP	959,0	35,1	67,4	3097,5	
	SFSDIPNPIGSENSEKTTMP	1076,0	40,0	67,4	1788,5	
	VAPFPE	659,3	33,0	123,0	525,7	
	YTDAPSFSDIPNPIGSENSEK	1134,5	51,5	453,6	494,5	
A0A0M3R7C5	VATLEDSPE	960,5	44,2	123,0	525,7	
B2Z898	AVESTVATL	890,5	33,3	158,1	1374,7	
	EIPTINT	787,4	37,7	13,1	789,5	
	IESPPEIN	898,4	44,9	55,6	1400,6	
	SPPEIN	656,3	35,5	55,6	1084,2	
	TVQVTSTAV	905,5	44,9	266,3	1313,3	
	VQVTSTAV	804,4	38,5	266,3	2228,9	AM
E7E1P8	VIEGPPEIN	967,5	43,2	55,6	265,9	
J9UHS4	SLVYFPFGPIHNSLPQ	883,5	51,6	33,3	838,5	

Protéine	Séquence	m/z	-10logP	ACE	DPPIV	MBPDB
				IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	
F Ctl I2						
Caséine β	AVPYPQ	674,4	33,8	33,3	798,3	
	AVPYPQRDMPI	643,8	25,3	187,5	1023,8	
	DELQDKIHPF	621,3	31,8	44,6	3144,1	
	DKIHPF	756,4	27,0	44,6	3637,5	ACEi
	DMPIQ	619,3	29,4	98,8	1783,8	
	DMPIQA	690,3	35,1	70,1	1018,5	
	EAMAPK	662,3	31,5	422,2	1373,5	AM
	EELNVPGE	886,4	33,3	26,8	2782,4	
	EMPFPK	764,4	33,2	422,2	1347,4	ACEi, AM
	EMPFPK	748,4	34,5	44,6	1847,8	
	EMPFPKYPVEPF	740,9	32,6	111,4	1681,1	
	EPVLGPV	710,4	28,4	291,8	1271,2	
	FPPQSV	674,4	30,8	167,3	232,2	
	GPFPII	643,4	26,6	556,4	2457,6	
	GPFPIIV	742,4	34,9	866,0	2346,1	
	GPVRGPFPI	939,5	39,9	187,5	2122,9	
	GPVRGPFPIIV	576,3	31,1	866,0	2346,1	
	HKEMPFPK	858,1	32,3	422,2	2544,9	AM
	HLPLPL	689,4	26,6	160,3	704,6	
	HQPHQLPPT	1151,6	58,7	62,7	1598,5	
	HQPHQLPPTV	625,8	34,1	287,7	2200,0	
	HQPHQLPPTVM	691,4	47,6	225,1	2247,5	
	IPPLTQTPVVVPPFLQPEV	921,1	35,9	313,5	-200,0	
	KAVPYPQ	802,4	43,4	33,3	1583,5	
	KIHPF	641,4	32,1	44,6	1514,3	
	LEELNVPGE	999,5	32,9	26,8	1630,7	
	LHLPLP	689,4	23,7	89,8	1779,2	ACEi
	LHLPLPL	802,5	28,0	160,3	1359,6	ACEi
	LNVPGEI	741,4	30,4	201,5	1413,5	
	LNVPGEIVE	969,5	38,5	241,0	1473,8	ACEi
	LQDKIHPF	831,5	38,6	44,6	1631,6	
	LTDVEN	690,3	31,2	20,1	217,5	
	LTDVENL	803,4	30,5	33,5	927,0	
	LTDVENLHLPLPL	737,4	57,0	160,3	886,0	
	LTLTDVEN	904,5	40,5	20,1	217,5	
	LTLTDVENLHLPLPL	844,5	31,9	160,3	886,0	
	LVYFPFGPI	1002,6	54,4	187,5	167,0	ACEi
	LVYFPFGPIPS	650,8	35,4	27,8	-344,7	
	LYQEPVLG	918,5	42,9	1219,6	1130,2	
	LYQEPVLGPV	1114,6	52,8	291,8	991,1	

Protéine	Séquence	m/z	-10logP	ACE	DPPIV	MBPDB
				IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	
Caséine β	MHQPHQPLPPT	649,8	44,1	422,2	246,0	AM
	MHQPHQPLPPT	641,8	60,4	287,7	1508,6	
	MHQPHQPLPPTV	691,4	55,9	225,1	1556,1	
	MHQPHQPLPPTVM	756,9	59,0	225,1	1556,1	
	MHQPHQPLPPTVM	764,9	56,1	225,1	1556,1	
	NIPPLTQT	883,5	44,9	29,2	687,7	
	NIPPLTQTPVVVPPFLQPEV	1093,1	26,3	313,5	994,1	
	NLHLPLPL	916,6	37,0	160,3	1323,2	
	NVPGEIVE	856,4	31,6	241,0	1316,7	
	PEVMGVS	734,3	33,9	260,7	3112,6	
	PFPGIPN	838,4	42,5	18,7	1438,7	
	PFTESQ	708,3	30,6	19,1	2084,7	
	PFTESQS	795,4	35,3	61,9	1256,3	
	PPFLQPEV	926,5	30,6	313,5	1574,4	
	PPFLQPEVMG	1114,6	28,5	915,2	1784,8	
	PPLTQT	656,4	26,6	29,2	1267,9	
	PQNIPPLTQT	1108,6	52,0	29,2	2462,8	
	PQNIPPLTQTPVVVPPF	922,5	48,7	44,6	3207,5	
	PQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEV	804,1	68,9	313,5	2769,2	
	PVEPFT	689,4	36,4	256,5	1360,7	
	PVLGPVRGPFPI	624,9	30,3	187,5	1743,0	
	PVVVPPF	754,4	36,2	44,6	1948,6	
	PVVVPPFL	867,5	39,5	656,1	1837,3	
	PVVVPPFLQ	995,6	42,4	111,4	1781,9	
	PVVVPPFLQPE	611,3	46,9	123,0	1347,2	
	PVVVPPFLQPEV	660,9	59,2	313,5	1510,3	
	PVVVPPFLQPEVM	726,4	71,9	225,1	1972,6	
	PVVVPPFLQPEVM	734,4	68,2	225,1	1972,6	
	PVVVPPFLQPEVMG	762,9	71,1	915,2	1720,8	
	PVVVPPFLQPEVMGV	812,4	66,5	915,2	1720,8	
	PVVVPPFLQPEVMGVS	856,0	57,8	63,5	1903,6	
	PVVVPPFLQPEVMG	754,9	67,1	260,7	1525,2	
	PVVVPPFLQPEVMGVS	848,0	40,2	260,7	1525,2	
	QDKIHPF	884,5	33,3	44,6	2966,4	
	QEPVLGPV	838,5	41,6	291,8	2741,8	
	QPLPPTVM	882,5	38,3	225,1	1559,6	
	QSLVYPFPGIPN	714,9	40,0	18,7	1453,8	
	SLPQNIPPLT	1079,6	34,1	209,7	909,2	
	SLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEV	870,8	46,7	313,5	831,4	
	SLTLTDVEN	991,5	33,0	20,1	452,8	
	SLTLTDVENL	1104,6	32,7	33,5	1162,2	

Protéine	Séquence	m/z	-10logP	ACE	DPPIV	MBPDB
				IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	
Caséine β	SLVYPPFGPI	1089,6	62,2	187,5	1064,0	
	SLVYPPFGPIP	650,8	41,1	18,7	573,9	
	TDVENL	690,3	27,5	33,5	2508,4	
	TDVENLHLPLP	624,3	34,7	89,8	2887,1	
	TDVENLHLPLPL	680,9	60,8	160,3	2467,5	
	TEDELQDKIHP	662,8	36,4	29,4	2718,9	
	TEDELQDKIHPF	736,4	45,4	44,6	2708,4	AM
	TLTDVEN	791,4	44,0	20,1	192,6	
	TLTDVENL	904,5	42,6	33,5	902,1	
	TLTDVENLHLPLPL	787,9	55,5	160,3	861,1	
	TPVVVPFLQPEV	711,4	46,8	313,5	746,8	
	VENLHLPLPL	763,5	34,9	160,3	2216,6	
	VPPFLQPEV	1025,6	34,7	313,5	403,4	
	VPYPQ	603,3	31,6	33,3	410,6	AOx
	VVPPFLQPEV	937,4	32,7	313,5	339,4	
	VYPPFG	679,3	30,1	364,6	1270,7	ACEi
	VYPPFGPI	889,5	53,1	187,5	1507,6	
	VYPPFGPIP	1100,6	66,7	18,7	1017,5	ACEi, AOx
	WMHQPHQLPPT	742,9	46,0	48,7	-536,3	
	WMHQPHQLPPTVM	857,9	45,1	62,7	-666,4	
	WMHQPH	835,4	27,5	62,7	-666,4	
	WMHQPHQLPPT	734,9	60,9	287,7	-65,0	
	WMHQPHQLPPTV	784,4	58,2	225,1	-17,5	
	WMHQPHQLPPTVM	849,9	68,5	225,1	-17,5	
	WMHQPHQLPPTVM	857,9	44,6	225,1	-17,5	
	WMHQPHQLPPTVMFPPQSV	790,7	38,2	167,3	22,8	
	YPFGPI	790,4	35,9	187,5	312,8	ACEi, IM
	YPFGPIP	1001,5	48,1	18,7	-177,4	ACEi, DPP-IVi
	YPVEPF	751,4	33,4	44,6	518,3	DPP-IVi
	YPVEPFT	852,4	31,8	256,5	-69,6	
	YQEPV	635,3	26,7	291,8	1396,1	
	YQEPVLG	805,4	40,7	1219,6	1535,2	
	YQEPVLGPV	1001,5	49,2	291,8	1396,1	
	YQEPVLGPVRGPFPI	835,0	53,9	187,5	1507,6	AM
	YQEPVLGPVRGPFPIV	941,0	38,9	866,0	1730,8	ACEi, IM, AM
Caséine α1	APFPEV	659,3	32,2	313,5	855,2	
	APFPEVFG	863,4	42,3	1492,1	888,0	
	AYFYPEL	902,4	38,8	172,3	1895,4	ACEi, AOx
	DAYPSGA	680,3	33,9	32,8	1436,4	
	EDVPSE	675,3	24,8	70,5	2799,1	
	EGIHAAQ	782,4	34,0	15,5	1209,9	

Protéine	Séquence	m/z	-10logP	ACE	DPPIV	MBPDB
				IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	
Caséine αs1	EGIHAAQKEPMIGVN	825,9	42,3	36,7	1400,1	ACEi
	EKTTMPL	819,4	29,8	160,3	3456,7	
	EPMIGVN	775,4	38,9	63,5	1543,4	
	EPMIGV	645,3	26,4	36,7	1227,6	
	EPMIGVN	759,4	35,7	36,7	1227,6	
	EPMIGVNQ	887,4	34,9	7,0	1198,2	
	FFVAPFPEV	1052,6	51,5	313,5	-148,5	
	FVAPFPEV	905,5	32,0	313,5	-334,4	
	FVAPFPEVFG	1109,6	58,9	1492,1	-301,5	
	HIQKEDVPSE	591,3	43,9	70,5	593,7	
	HIQKEDVPSEK	669,3	52,2	407,3	381,3	
	HPIKH	631,4	24,6	239,6	124,5	
	HQGLPQ	679,4	29,2	33,3	1792,3	
	HQGLPQE	808,4	43,3	57,2	1502,3	
	HQGLPQEV	907,5	40,9	313,5	1785,2	
	IGVNQE	659,3	28,8	57,2	-310,4	
	IPNPIGSENSEK	642,8	34,7	453,6	-383,2	
	IQKEDVPSE	1044,5	32,8	70,5	1213,2	
	KHQGLPQ	807,4	34,4	33,3	2369,2	
	KHQGLPQEV	1035,6	36,0	313,5	2362,1	
	LDAYPSGA	793,4	37,0	32,8	1397,6	
	MKEGIHA	785,4	36,7	165,0	1739,2	
	PFPEVFG	792,4	33,7	1492,1	1729,0	
	PMIGVN	630,3	26,2	36,7	1911,3	
	QGLPQEV	770,4	34,3	313,5	1269,8	
	QKEPMIG	802,4	31,1	1081,9	3444,5	
	QKEPMIGV	901,5	32,3	63,5	3507,3	
	QKEPMIGVN	1015,5	42,1	36,7	3191,5	
	QKEPMIGVNQEL	693,4	34,6	172,3	3282,8	
	QLDAYPS	793,4	36,4	133,0	601,7	
	QLDAYPSGA	921,4	46,3	32,8	890,2	
	QQKEPMIGV	1029,5	36,6	63,5	2685,5	
	SDIPNPI	755,4	27,0	187,5	2670,4	
	SDIPNPIG	812,4	30,3	1081,9	2768,3	
	SDIPNPIGSE	1028,5	40,5	70,5	2656,0	
	SDIPNPIGSEN	1142,5	58,9	20,1	2059,2	
	SDIPNPIGSENSEK	743,9	67,0	453,6	2254,5	AM
	SDIPNPIGSENSEKT	794,4	45,4	308,6	1841,8	
	SFSDIPNPI	989,5	46,2	187,5	1361,4	
	VAPFPEV	758,4	40,6	313,5	688,9	
	VAPFPEVVF	905,5	37,3	87,5	1462,1	

Protéine	Séquence	m/z	-10logP	ACE	DPPIV	MBPDB
				IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	
Caséine αs1	VAPFPEVFG	962,5	36,4	1492,1	721,7	AOx
	VAPFPEVFGKE	1016,5	49,9	605,8	116,5	
	VPLGTQ	614,4	33,8	32,8	704,2	
	YFYPEL	831,4	32,7	172,3	370,6	
	YLGYLEQLLR	634,4	33,1	1267,9	295,9	
	YQLDAYPS	956,4	31,5	133,0	954,9	
	YQLDAYPSGA	1084,5	48,8	32,8	1243,4	
	YTDAPS	653,3	32,4	133,0	357,7	
	YTDAPSF	800,3	37,5	25,6	1497,4	
	YTDAPSFSDIPNPI	768,9	32,1	187,5	910,4	
	YVPLGT	649,4	24,9	13,6	101,5	
	YVPLGTQ	777,4	41,3	32,8	316,8	
Caséine αs2	ALNEINQ	801,4	28,0	7,0	727,7	
	AVPITPT	698,4	27,7	62,7	604,5	
	ITVDDK	690,4	28,4	1540,3	410,7	
	ITVDDKH	827,4	40,9	239,6	-68,1	
	LYQGPIV	789,5	49,4	866,0	1325,8	
	NAVPIT	614,4	25,0	186,0	1642,4	
	NAVPITPT	812,4	45,0	62,7	1307,7	
	NPWDQV	758,3	36,0	135,8	1210,3	
	PIVLNPWDQV	787,4	39,4	135,8	1360,9	
	QGPIVLNPWDQV	683,4	34,6	135,8	1271,2	
	TVDMESTEV	1010,4	32,4	313,5	682,8	
	VKITVDDK	917,5	41,7	1540,3	2433,0	
	VLNPWDQV	970,5	43,1	135,8	229,2	
	YQGPIV	676,4	31,5	866,0	1730,8	
	YQGPIVLNPWDQ	715,4	39,5	121,5	1357,1	
	YQGPIVLNPWDQV	764,9	45,9	135,8	1276,3	
	YQGPIVLNPWDQVK	828,9	48,2	827,2	1547,9	
	YQKFPQ	810,4	33,1	33,3	1282,1	
β-LGB	EKFDK	666,3	31,4	1540,3	3179,7	
	ELKPTPEGDL	1098,6	44,2	584,9	1339,4	
	IDALNE	674,3	30,0	25,7	1108,6	
	IDALNEN	788,4	31,3	20,1	852,2	
	ISLLDAQSAPL	1127,6	33,1	160,3	703,9	
	IVTQTM	692,4	32,9	113,3	156,9	
	KIDALNE	802,4	41,5	25,7	953,8	
	KPTPEGDL	856,4	35,8	584,9	1655,9	
	LIVTQT	674,4	31,9	29,2	-522,8	
	LIVTQTM	805,4	45,5	113,3	204,6	
	LIVTQTMK	933,5	48,8	1059,7	-63,8	

Protéine	Séquence	m/z	-10logP	ACE	DPPIV	MBPDB
				IC ₅₀ (µM)	IC ₅₀ (µM)	
β-LGB	LKPTPEGDL	969,5	42,3	584,9	2380,0	DPP-IVi
	LVLDTDY	838,4	36,2	685,2	365,8	
	SDISLLDAQSAPLRV	792,9	32,3	2181,7	1899,6	
	SLAMAASDISL	730,0	29,7	684,1	1139,1	
	SLAMAASDI	878,4	45,5	394,8	846,0	
	SLAMAASDIS	965,5	42,3	91,9	1502,7	
	SLAMAASDISL	1078,5	44,3	91,9	1502,7	
	SLAMAASDISLLDAQSAPL	937,5	64,2	160,3	1121,3	
	SLAMAASDISLLDAQSAPLR	1015,5	82,6	1267,9	1222,8	
	SLAMAASDISLLDAQSAPLRV	946,8	54,6	2181,7	293,2	
	SLLDAQ	646,3	27,5	30,4	1347,9	
	SLLDAQSAPL	1014,5	33,1	160,3	1121,3	
	TPEVDDEAL	988,4	44,3	146,3	1546,2	DPP-IVi, AM
	TPEVDDEALEK	623,3	49,4	453,6	563,6	
	TPEVDDEALEKFDK	727,6	55,9	1540,3	759,8	
	VEELKPTPEGDL	663,8	63,9	584,9	2291,7	
	VEELKPTPEGDLE	728,4	52,5	411,5	2028,0	
	VEELKPTPEGDLEI	784,9	53,4	201,5	2038,2	
	VEELKPTPEGDLEIL	841,4	53,7	475,8	2551,3	ACEi, DPP-IVi
	VLDTDY	725,3	35,1	685,2	659,2	
	VLDTDYK	853,4	43,4	828,7	-54,1	
	VLVLDTD	774,4	31,3	55,0	157,0	DPP-IVi, AM
	VLVLDTDY	937,5	48,3	685,2	659,2	
	VLVLDTDYK	1065,6	41,1	828,7	-54,1	
	VRTPEVDD	930,5	36,6	203,3	2373,9	
	VRTPEVDDEA	754,0	47,5	161,9	2238,5	
	VYVEELKPTPEGD	738,4	36,8	12,1	1182,6	
	VYVEELKPTPEGDL	794,9	48,1	584,9	1639,9	
	VYVEELKPTPEGDLEI	916,0	50,4	201,5	1386,4	
	VYVEELKPTPEGDLEIL	972,5	62,7	475,8	1899,5	
	YVEELKPTPEGD	688,8	53,9	12,1	-76,3	
	YVEELKPTPEGDL	745,4	64,6	584,9	381,0	
	YVEELKPTPEGDLE	809,9	54,3	411,5	117,3	
	YVEELKPTPEGDLEI	866,4	46,3	201,5	127,5	
	YVEELKPTPEGDLEIL	923,0	42,7	475,8	640,6	
Pepsine	AIVDTGTS	763,4	41,8	131,2	614,0	
	AIVDTGTSL	876,5	45,5	91,9	1311,7	
	DTVQVGGI	788,4	36,9	40,8	2285,0	
	FDNIWDQG	994,4	43,8	169,6	1036,5	
	FDNIWDQGLV	804,7	45,3	976,1	1546,1	
	FDTGSSNL	840,4	38,8	33,5	1491,3	

Protéine	Séquence	m/z	-10logP	ACE	DPPIV	MBPDB
				IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	
Pepsine	FGTIGIGTPA	933,5	35,3	150,7	-401,6	
	GGISDTNQI	904,4	31,0	87,2	2175,6	
	GILGYDTV	837,4	46,4	287,7	2090,2	
	GLAYPSIS	807,4	30,5	394,8	1729,3	
	GLSETEPGS	876,4	33,9	29,0	1666,8	
	GTIGIGTPA	786,4	36,7	150,7	2184,2	
	GTPAQDF	735,3	34,8	162,9	3001,2	
	GTPAQDFT	836,4	35,1	256,5	2338,3	
	IGTPAQD	701,3	34,1	25,9	-511,7	
	SIDSLPDI	859,4	29,8	684,1	1099,8	
	SIDSLPDIV	958,5	43,1	866,0	1248,0	
	TVIFDTGSS	926,4	43,9	76,3	744,1	
	TVIFDTGSSN	1040,5	51,1	10,7	806,7	
	TVIFDTGSSNL	1153,6	49,0	33,5	1013,6	
	VDGTSL	692,3	25,3	91,9	2505,5	
A0A0M3R7C5	ARHPPH	851,4	29,1	48,7	3058,6	
	AVESTV	605,3	30,1	287,7	1205,9	
	EDSPEVIESPPEINT	828,4	39,3	13,1	2435,1	
	ESPPEIN	785,4	34,0	55,6	1841,2	
	ESPPEINT	886,4	47,6	13,1	1618,2	
	FLPYPY	799,4	26,7	187,8	-89,6	
	HPHPH	624,3	29,5	48,7	533,8	
	IESPPEINT	999,5	43,7	13,1	1177,6	
	LPYPY	652,3	25,3	187,8	354,8	
	MAIPPK	656,4	27,3	62,7	907,1	
	NNQFLPYYP	992,5	31,3	52,7	2737,6	
	NQDKTEIPTINT	687,3	40,7	13,1	2258,1	
	SPAQILQ	756,4	33,7	111,4	1278,6	
	TEIPTINT	888,5	47,0	13,1	2124,4	
	VIESPPEINT	1098,6	45,1	13,1	42,9	
	VQVTSTAV	804,4	39,1	266,3	2228,9	
A5PJW4	YAKPAA	620,3	31,6	137,5	571,2	
	YPSYGLN	813,4	41,7	62,7	87,1	
	YQQKPVA	833,5	30,3	295,3	1306,2	
	ALVDTGTS	763,4	41,8	131,2	653,2	
B5B3R8	SDIPNPIGSENSGK	707,8	48,1	91,9	2647,8	
CHIA	SGAGPAGPY	776,4	45,5	187,8	1535,8	
E1AXU0	GPFPLL	643,4	26,6	536,3	2444,6	
E1B9F5	LDAINE	674,3	30,0	25,7	1307,0	
E1BB93	NAVPLT	614,4	25,0	209,7	1572,2	
E1BK38	EMPLQ	633,3	26,9	422,2	1347,4	
E1BMU3	VIVLDTD	774,4	31,3	55,0	117,8	

Protéine	Séquence	m/z	-10logP	ACE	DPPIV	MBPDB
				IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	
E7E1Q1	IASGEPTSTPTIE	651,8	29,1	365,1	257,0	
EPYC	DNNLDHIPLPL	630,8	35,9	160,3	2776,0	
	HIPLPL	689,4	26,6	160,3	665,4	
	TDNNLDHIPLPL	681,4	46,4	160,3	2467,5	
F1MIX6	EHVIFPGA	869,4	26,9	32,8	2189,7	
G3N0E0	ALVDTGTSL	876,5	45,5	91,9	1350,9	
J9UHS4	HNSLPQ	695,3	30,2	33,3	1901,0	
	HNSLPQNIPPLTQT	780,4	49,7	29,2	1587,4	
	LVYFPFGPIHN	627,3	34,2	20,5	-319,4	
	LVYFPFGPIHNSLPQ	840,0	42,4	33,3	-58,5	
	QSLVYFPFGPIHN	734,9	40,6	20,5	1457,5	
	QSLVYFPFGPIHNSLPQ	947,5	33,5	33,3	1718,4	
	VYFPFGPIHN	1140,6	61,1	20,5	1021,2	
	VYFPFGPIHNS	614,3	36,0	27,8	995,8	
	VYFPFGPIHNSLPQ	783,4	57,5	33,3	1282,1	
P02663	PIVLNPWD	953,5	45,2	363,2	765,9	
PIGR	QVLEPEPEL	1053,5	31,9	172,3	1202,1	
Q1RMN8	ISDFYPGSVT	1085,5	33,4	122,8	562,2	
	SVSGSLGQ	734,4	28,1	7,2	1222,2	
Q28049	DDDLTDDIM	1052,4	28,2	341,0	3075,3	
	DLTDDIM	822,4	28,5	341,0	1469,0	
	FLDDDLTDD	1068,4	33,8	203,3	-735,4	
	GGVSLPEWV	943,5	40,8	1902,0	1954,7	
	GYGGVSLPEWV	1163,6	45,0	1902,0	2653,7	
	ILDKVGIN	871,5	33,2	55,6	-298,3	
	LDDDLTDDIM	1165,5	36,7	341,0	1891,2	
Q28157	DSITMDGETIA	1152,5	31,1	447,2	1827,4	
Q85PG9	TVLFDTGSS	926,4	43,9	76,3	744,1	
Q95M17	AIDLDDFTGT	1067,5	32,8	13,6	725,9	
SPT22	NPELPPLTKT	1109,6	34,8	308,6	613,0	

F 45a I2

Caséine β	EAMAPK	646,3	37,9	422,2	1373,5	AM
	EMPFPK	748,4	33,3	422,2	1347,4	ACEi, AM
	FPPQSV	674,4	34,8	167,3	232,2	
	KIHFP	641,4	30,8	44,6	1514,3	
	KVLPVPQ	780,5	26,9	33,3	1234,0	ACEi
	LHLPLPL	802,5	27,7	160,3	1359,6	ACEi

Protéine	Séquence	m/z	-10logP	ACE	DPPIV	MBPDB
				IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	
Caséine β	LQDKIHFP	997,5	34,3	44,6	1631,6	ACEi
	LVYPFPGPI	1002,6	56,2	187,5	167,0	
	MHQPHQPLPPT	641,8	39,8	62,7	907,1	
	NIPPLTQT	883,5	44,5	29,2	687,7	
	NLHLPLPL	916,6	40,2	160,3	1323,2	
	NVPGEI	628,3	26,1	201,5	1256,4	
	PFTESQ	708,3	30,9	19,1	2084,7	
	PFTESQS	795,4	35,0	61,9	1256,3	
	PQNIPPLTQT	1108,6	57,6	29,2	2462,8	
	PVEPFT	689,3	34,8	256,5	1360,7	
	PVVVPPF	754,4	44,4	44,6	1948,6	
	PVVVPPFL	867,5	33,2	656,1	1837,3	
	PVVVPPFLQPEV	660,9	54,3	313,5	1510,3	
	PVVVPPFLQPEVM	726,4	55,0	225,1	1972,6	
	PVVVPPFLQPEVMG	762,9	54,2	915,2	1720,8	
	PVVVPPFLQPEVMG	754,9	55,7	915,2	1720,8	
	SLVYPFPGPI	1089,6	63,8	187,5	1064,0	AM
	TEDELQDKIHP	662,8	31,0	29,4	2718,9	
	TEDELQDKIHFP	736,4	45,1	44,6	2708,4	
	TQTPVVVPPF	1084,6	35,0	44,6	2380,0	
	VYPFPGPI	889,5	55,3	187,5	1507,6	ACEi, AOx
	VYPFPGPIPN	917,3	45,8	18,7	1017,5	
	WMHQPHQPLPPT	734,9	52,7	62,7	-666,4	
	YPVEPF	751,4	30,4	44,6	518,3	DPP-IVi
	YQEPV	635,3	28,8	291,8	1396,1	
	YQEPVLG	805,4	38,2	1219,6	1535,2	
Caséine αs1	HIQKEDVPSE	984,8	37,8	70,5	593,7	
	HQGLPQE	808,4	31,3	57,2	1502,3	
	LDAYPSG	722,3	26,7	209,0	1806,4	
	SDIPNPIG	812,4	29,1	1081,9	2768,3	
	VAPFPEV	758,4	29,9	313,5	688,9	
	VAPFPEVFG	962,5	39,3	1492,1	721,7	
	YQLDAYPSGA	1084,5	35,6	32,8	1243,4	
	YTDAPS	653,3	28,8	133,0	357,7	
Caséine αs2	ITVDDK	690,4	28,5	1540,3	410,7	
	ITVDDKH	827,4	29,4	239,6	-68,1	
	NAVPIPTPT	812,5	44,3	62,7	1307,7	
	VKITVDDK	917,5	32,8	1540,3	2433,0	
	YQGPIV	676,4	28,6	866,0	1730,8	
α-lactalbumine	DDDLTDDIM	1052,4	45,2	341,0	3075,3	
	DLTDDIM	822,4	32,4	341,0	1469,0	

Protéine	Séquence	m/z	-10logP	ACE	DPPIV	MBPDB
				IC ₅₀ (µM)	IC ₅₀ (µM)	
α-lactalbumine	FLDDDLTD	953,4	34,6	55,0	-516,8	
	GGVSLPEWV	943,5	38,5	1902,0	1954,7	
	IVQNNSTE	1019,5	43,9	121,3	-133,5	
	LDDDLTDD	921,4	45,8	203,3	1139,8	
	LDDDLTDDI	1034,5	39,5	684,1	1736,9	
	LDDDLTDDIM	1165,5	51,6	341,0	1891,2	
β-LGB	EELKPTPEGDL	614,3	51,9	584,9	3038,3	
	EKFDDK	666,4	31,5	1540,3	3179,7	
	EKFDDKA	737,4	31,7	742,0	2453,7	
	ELKPTPE	813,4	26,8	123,0	811,3	
	ELKPTPEGD	985,5	41,3	12,1	882,2	
	ELKPTPEGDL	915,6	43,6	584,9	1339,4	
	ELKPTPEGDLE	818,7	47,1	411,5	1075,8	
	ELKPTPEGDLEI	670,9	37,3	201,5	1086,0	
	GLDIQK	673,4	28,0	196,4	1532,8	ACEi
	GLDIQKVAGTWY	675,9	42,1	1224,1	1841,9	
	GLDIQKVAGTWYSLAMAASD	1049,0	35,0	32,0	1731,6	
	GLDIQKVAGTWYSLAMAASDI	1105,6	44,7	684,1	2022,3	
	IDALNE	674,3	30,1	25,7	1108,6	
	IVTQTM	692,4	30,9	113,3	156,9	
	KIDALNE	802,4	42,3	25,7	953,8	
	KIIAE	573,4	26,8	112,3	1422,3	
	KPTPEGDL	856,4	35,7	584,9	1655,9	
	LIVTQTM	805,4	46,9	113,3	204,6	
	LIVTQTM	821,4	42,3	113,3	204,6	
	LIVTQTMK	933,5	53,9	1059,7	-63,8	
	LIVTQTMKGLDIQK	794,5	48,9	196,4	-398,2	
	LKPTPEGD	856,4	34,8	12,1	1922,8	
	LKPTPEGDL	969,5	40,0	584,9	2380,0	DPP-IVi
	LKPTPEGDLE	1098,6	34,9	411,5	2116,4	DPP-IVi
	LVLDTD	675,4	27,1	55,0	-136,5	
	LVLDTDY	838,4	37,9	685,2	365,8	
	SLAMAASD	765,3	41,5	32,0	848,3	
	SLAMAASDI	878,4	52,4	684,1	1139,1	
	SLAMAASDIS	965,5	35,3	394,8	846,0	
	SLAMAASDISL	1078,5	43,5	91,9	1502,7	
	SLAMAASDISLLDAQ	753,4	37,1	30,4	1347,9	
	SLAMAASDISLLDAQSAPL	937,5	42,9	160,3	1121,3	
	SLLDAQ	646,3	27,2	30,4	1347,9	
	TPEVDD	675,3	35,7	203,3	457,4	
	TPEVDDE	804,3	40,2	448,8	658,7	

Protéine	Séquence	m/z	-10logP	ACE	DPPIV	MBPDB
				IC ₅₀ (µM)	IC ₅₀ (µM)	
β-LGB	TPEVDDEA	875,4	52,3	161,9	321,9	
	TPEVDDEAL	988,4	50,3	146,3	1546,2	
	VAGTWYSLAMAASDISL	878,4	40,0	91,9	1360,2	
	VAGTWYSLAMAASDISLL	935,0	44,7	536,3	1243,3	
	VEELKPTPE	1041,5	36,8	123,0	1763,5	
	VEELKPTPEGDL	663,8	47,5	584,9	2291,7	
	VEELKPTPEGDLE	728,4	50,3	411,5	2028,0	
	VEELKPTPEGDLEIL	841,4	43,3	475,8	2551,3	
	VLDTD	562,3	24,6	55,0	157,0	
	VLDTDY	725,3	36,6	685,2	659,2	ACEi, DPP-IVi
	VLDTDYK	853,4	38,4	828,7	-54,1	ACEi
	VRTPEVDD	775,5	40,6	203,3	2373,9	
	VRTPEVDDE	706,7	38,4	448,8	2575,2	
	VRTPEVDDEA	565,8	50,3	161,9	2238,5	
	VTQTMK	707,4	28,2	1059,7	1153,7	
	VYVEELKPTPEGDL	794,9	40,7	584,9	1639,9	
	VYVEELKPTPEGDLEI	916,0	43,1	201,5	1386,4	
	YVEELKPTPEGD	688,8	39,7	12,1	-76,3	
	YVEELKPTPEGDL	745,4	45,8	584,9	381,0	
	YVEELKPTPEGDLE	809,9	47,1	411,5	117,3	
	YVEELKPTPEGDLEIL	923,0	45,7	475,8	640,6	
Pepsine	AIVDTGT	676,4	36,6	13,6	725,9	
	AIVDTGTS	763,4	43,4	131,2	614,0	
	AIVDTGTSL	876,5	46,9	91,9	1311,7	
	DTGSSNL	693,3	34,7	33,5	2111,1	
	DTVQVGGI	788,4	34,6	40,8	2285,0	
	FDNIWDQG	994,4	43,3	169,6	1036,5	
	FDTGSS	613,2	28,3	76,3	1221,8	
	FDTGSSN	727,3	43,9	10,7	1284,4	
	FGTIGIGTPA	933,5	35,6	150,7	-401,6	
	GGISDTN	663,3	36,2	18,5	2098,9	
	GGISDTNQ	791,4	37,7	7,0	2110,8	
	GLAYPSIS	807,4	36,0	394,8	1729,3	
	GTIGIGTPA	786,4	42,7	150,7	2184,2	
	GTIGIGTPAQD	1029,5	57,1	25,9	2003,7	
	GTPAQDF	735,3	42,6	162,9	3001,2	
	IGTPAQD	701,3	38,5	25,9	-511,7	
	IVDTGTS	692,3	37,0	131,2	-290,4	
	IVDTGTSL	805,4	36,9	91,9	407,3	
	NIWDQGLV	944,5	38,7	976,1	1379,7	
	QVGGISDTN	890,4	52,1	18,5	1069,5	

Protéine	Séquence	m/z	-10logP	ACE	DPPIV	MBPDB
				IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	
Pepsine	QVGGISDTNQ	1018,5	57,6	7,0	1081,4	
	QVGGISDTNQI	1131,6	43,6	87,2	1146,2	
	SIDSLPDIV	958,5	48,2	866,0	1248,0	
	VGGISDT	648,3	30,1	228,7	464,3	
	VGGISDTNQ	890,4	47,5	7,0	624,0	
	VIFDTGSS	825,4	44,9	76,3	250,0	
	WDQGLVS	804,4	26,0	260,7	706,5	
	WILGDV	702,4	29,6	1064,6	-757,9	
	YAPFDGIL	895,5	26,0	475,8	990,2	
	YAPFDGILG	952,5	29,8	1219,6	625,8	
	YGTGSM	615,2	32,0	65,9	761,3	
A0A0M3R7C5	EIPTINT	787,4	31,6	13,1	789,5	
	ESPPEIN	785,4	33,5	55,6	1841,2	
	ESPPEINT	886,4	47,5	13,1	1618,2	
	IESPPEIN	898,5	36,3	55,6	1400,6	
	IESPPEINT	999,5	49,0	13,1	1177,6	
	LEDSPPEV	788,4	29,6	313,5	1521,7	
	NQDKTEIPT	1045,5	27,7	62,7	2217,1	
	TEIPTIN	787,4	34,1	55,6	2347,3	
	TEIPTINT	888,5	47,1	13,1	2124,4	
	VQVTSTAV	804,4	42,6	266,3	2228,9	
	YAKPAA	620,3	26,3	137,5	571,2	
A5PJW4	ALVDTGT	676,4	36,6	13,6	765,1	
	ALVDTGTS	763,4	43,4	131,2	653,2	
	LVDGTGS	692,3	37,0	131,2	-92,0	
A5PJW4	WLLGDV	702,4	29,6	1064,6	-718,6	
CATD	YTVFD	644,3	26,5	228,1	350,3	
E1BKJ9	KILAE	573,4	26,8	112,3	1422,3	
E7E1P8	IEGPPEINT	969,5	37,7	13,1	1177,6	
F1MH27	AIDLDDFTGT	1067,5	33,9	13,6	725,9	
	SGAGPAGPY	776,4	36,1	187,8	1535,8	
F1MLW7	SVSGSLGQ	734,4	31,6	7,2	1222,2	
	YQQVPGSGL	948,5	36,4	34,9	1837,0	
F1MP21	ALVFVDNHDNQR	714,4	50,6	176,4	686,8	
	NVVDGQPF	875,4	36,8	44,6	1583,1	
	SISNSAEDPF	1066,5	43,6	44,6	1230,4	
F1MP81	LDALNE	674,3	30,1	25,7	1307,0	
F1MPA5	DTGSSNI	693,3	34,7	39,2	2053,8	
F1MWS3	VLFDTGSS	825,4	44,9	76,3	289,2	
F1N0T6	KLIAE	573,4	26,8	112,3	1461,6	
G3N0E0	LVDGTGSL	805,4	36,9	91,9	605,7	
	ALVDTGTSL	876,5	46,9	91,9	1350,9	

Protéine	Séquence	m/z	-10logP	ACE	DPPIV	MBPDB
				IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	
G3N0E0	SYMPEPVT	923,4	42,9	122,8	2026,7	
	YMPEPVT	836,4	30,3	122,8	487,8	
G5E533	LDAINE	674,3	30,1	25,7	1307,0	
KASH5	KLLAE	573,4	26,8	112,3	1461,6	
Q28157	DSITMDGET	968,4	41,8	67,3	1488,6	
	DSITMDGETI	1081,5	38,6	184,9	2322,8	
	YTGSLN	654,3	30,2	62,7	684,8	
Q3MHH8	NWGEWGFMPSTR	769,8	40,4	1382,9	1663,2	
Q6LBN7	FGSPPGQ	689,3	29,9	7,2	181,4	
	VTLDGGM	692,3	34,7	25,0	1400,6	

F 49d I2

Caséine β	AVPYPQ	674,4	30,0	33,3	798,3	
	AVPYPQRDMPIQ	707,9	33,7	98,8	1133,0	
	DKIHPF	756,4	25,9	44,6	3637,5	ACEi
	DMPIQ	619,3	28,5	98,8	1783,8	
	DMPIQA	690,3	34,3	98,8	1783,8	
	DMPIQ	603,3	25,1	70,1	1018,5	
	EAMAPK	662,3	33,8	422,2	1373,5	AM
	EELNVPGE	886,4	34,5	26,8	2782,4	
	ELNVPGE	757,4	29,5	26,8	1083,5	
	EMPFPK	764,4	34,1	422,2	1347,4	ACEi, AM
	EPVLGPV	710,4	29,3	291,8	1271,2	
	FPPQSV	674,4	33,6	167,3	232,2	
	GPFPII	643,4	24,6	556,4	2457,6	
	GPFPIV	742,4	32,0	866,0	2346,1	
	GPVRGPFPI	626,7	41,2	187,5	2122,9	
	HKEMPFPK	686,7	41,3	422,2	2544,9	AM
	HLPLPL	689,4	24,5	160,3	704,6	
	HQPHQPLPPT	1151,6	59,5	62,7	1598,5	
	HQPHQPLPPTV	625,8	32,9	287,7	2200,0	
	HQPHQPLPPTVM	691,4	46,3	225,1	2247,5	
	IPPLTQT	769,4	31,0	29,2	-506,4	DPP-IVi
	KAVPYPQ	802,4	39,7	33,3	1583,5	
	KIHPF	641,4	30,3	44,6	1514,3	
	LHLPLPL	802,5	28,5	160,3	1359,6	ACEi
	LNVPGEI	741,4	26,6	201,5	1413,5	
	LNVPGEIVE	969,5	34,9	241,0	1473,8	ACEi

Protéine	Séquence	m/z	-10logP	ACE	DPPIV	MBPDB
				IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	
Caséine β	LTDVEN	690,3	29,0	20,1	217,5	ACEi
	LTDVENLHLPLPL	737,4	29,3	160,3	886,0	
	LTLTDVEN	904,5	35,3	20,1	217,5	
	LVYFPFGPI	1002,6	50,3	187,5	167,0	
	LYQEPV	748,4	28,1	291,8	991,1	
	LYQEPVLG	918,5	42,1	1219,6	1130,2	
	MHQPHQPLPPT	641,8	61,6	62,7	907,1	
	MHQPHQPLPPTV	691,4	48,6	287,7	1508,6	
	MHQPHQPLPPTVM	756,9	56,1	225,1	1556,1	
	NIPPLTQT	883,5	43,4	29,2	687,7	
	NIPPLTQTPVVVPPFLQPEV	1093,1	35,8	313,5	994,1	ACEi
	NLHLPLP	803,5	26,4	89,8	1742,9	
	NLHLPLPL	916,6	38,8	160,3	1323,2	
	NVPGEIVE	856,4	33,5	241,0	1316,7	
	PEVMGV	647,3	34,5	63,5	3490,9	
	PFPGIPN	838,4	42,0	18,7	1438,7	
	PFTESQ	708,3	31,0	19,1	2084,7	
	PFTESQS	795,3	36,5	61,9	1256,3	
	PGIPN	594,3	22,9	18,7	1489,4	IM
	PPFLQPEV	926,5	31,4	313,5	1574,4	
	PPLTQT	656,4	26,8	29,2	1267,9	
	PQNIPPLTQT	924,0	58,0	29,2	2462,8	
	PQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEV	804,1	42,3	313,5	2769,2	
	PVEPF	588,3	23,0	44,6	1948,6	
	PVEPFT	689,4	36,2	256,5	1360,7	
	PVVVPPF	754,4	41,8	44,6	1948,6	
	PVVVPPFL	867,5	38,9	656,1	1837,3	
	PVVVPPFLQPEV	660,9	56,2	313,5	1510,3	
	PVVVPPFLQPEVM	726,4	74,1	225,1	1972,6	
	PVVVPPFLQPEVM	734,4	70,1	225,1	1972,6	
	PVVVPPFLQPEVMG	762,9	68,2	915,2	1720,8	
	PVVVPPFLQPEVMGV	812,4	62,8	915,2	1720,8	
	PVVVPPFLQPEVMGVS	856,0	64,7	63,5	1903,6	
	PVVVPPFLQPEVMG	754,9	73,2	260,7	1525,2	
	PVVVPPFLQPEVMGVS	848,0	42,3	260,7	1525,2	
	QDKIHPF	884,5	28,3	44,6	2966,4	
	QEPVLGPV	838,5	36,3	291,8	2741,8	
	QPLPPTVM	882,5	34,8	225,1	1559,6	
	SLPQNIPPLT	1079,6	30,2	209,7	909,2	
	SLPQNIPPLTQT	654,9	45,5	29,2	524,9	
	SLVYFPFGPI	1089,6	71,3	187,5	1064,0	

Protéine	Séquence	m/z	-10logP	ACE	DPPIV	MBPDB
				IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	
Caséine β	TDVENL	690,3	28,8	33,5	2508,4	
	TDVENLHLPLPL	680,9	53,9	160,3	2467,5	
	TEDELQDKIHFP	736,4	37,3	44,6	2708,4	AM
	TLTDVE	677,3	24,0	241,0	743,0	
	TLTDVEN	791,4	46,7	20,1	192,6	
	TLTDVENL	904,5	44,3	33,5	902,1	
	TPVVVPPF	855,5	36,5	44,6	1185,1	
	TPVVVPPFLQPEV	711,4	54,7	313,5	746,8	
	TQTPVVVPPFLQPEV	826,0	38,1	313,5	1941,7	
	VENLHLPLPL	1144,7	37,3	160,3	2216,6	
	VYFPFG	679,3	31,6	364,6	1270,7	ACEi
	VYFPFGPI	889,5	53,0	187,5	1507,6	
	VYFPFGPIP	1100,6	60,3	18,7	1017,5	ACEi, AOx
	VYFPFGPIPNS	989,8	64,5	27,8	995,8	
	WMHQPHQPLPPT	742,9	42,2	48,7	-536,3	
	WMHQPH	835,4	26,6	62,7	-666,4	
	WMHQPHQPLPPT	734,9	70,0	62,7	-666,4	
	WMHQPHQPLPPTV	784,4	47,2	287,7	-65,0	
	WMHQPHQPLPPTVM	849,9	65,1	225,1	-17,5	
	YFPFGPI	790,4	33,6	187,5	312,8	ACEi, IM
	YFPFGPIP	1001,5	42,9	18,7	-177,4	ACEi, DPP-IVi
	YPVEPF	751,4	31,3	44,6	518,3	DPP-IVi
	YPVEPFT	852,4	34,4	256,5	-69,6	
	YQEPV	635,3	24,4	291,8	1396,1	
	YQEPVLG	805,4	42,5	1219,6	1535,2	
	YQEPVLGPV	1001,5	43,0	291,8	1396,1	
	YQEPVLGPVRGPF	729,9	37,4	44,6	1713,2	
	YQEPVLGPVRGPFPI	835,0	49,5	187,5	1507,6	AM
Caséine α1	APFPEV	659,3	28,7	313,5	855,2	
	AYFYPE	789,3	24,2	123,0	1563,5	ACEi, AOx
	AYFYPEL	902,4	38,1	172,3	1895,4	ACEi, AOx
	DAYPSGA	680,3	35,7	32,8	1436,4	
	EKTTMPL	819,4	24,5	160,3	3456,7	
	EPMIGVN	775,4	33,3	36,7	1227,6	
	EPMIGVN	759,4	40,2	36,7	1227,6	
	FSDIPNPI	902,5	30,0	187,5	576,2	
	FVAPFPEV	905,5	31,3	313,5	-334,4	
	FVAPFPEVFG	924,8	42,0	1492,1	-301,5	ACEi
	FYPEL	668,3	23,8	172,3	769,9	ACEi, AOx
	HPIKH	631,4	24,2	239,6	124,5	
	HQGLPQ	679,4	28,0	33,3	1792,3	

Protéine	Séquence	m/z	-10logP	ACE	DPPIV	MBPDB
				IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	
Caséine αs1	HQGLPQE	808,4	34,4	57,2	1502,3	
	HQGLPQEV	907,5	42,8	313,5	1785,2	
	KTTMPL	690,4	33,2	160,3	2178,5	
	LDAYPS	665,3	23,0	133,0	1109,2	
	LEIVPN	684,4	24,6	18,7	1264,3	
	MKEGIHA	785,4	32,7	165,0	1739,2	
	PFPEVFG	792,4	31,6	1492,1	1729,0	
	PMIGVN	630,3	25,6	36,7	1911,3	
	QGLPQEV	770,4	34,1	313,5	1269,8	
	QKEPMIGV	901,5	35,4	63,5	3507,3	
	QKEPMIGVN	846,4	34,9	36,7	3191,5	
	QLDAYPSGA	921,4	31,9	32,8	890,2	
	QQKEPMIGV	1029,5	30,1	63,5	2685,5	
	QQKEPMIGVN	1143,6	40,6	36,7	2369,7	
	SDIPNPI	755,4	26,0	187,5	2670,4	
	SDIPNPIG	812,4	34,7	1081,9	2768,3	
	SDIPNPIGSEN	1142,5	55,2	20,1	2059,2	
	SDIPNPIGSENSEK	743,9	68,8	453,6	2254,5	AM
	SDIPNPIGSENSEKT	794,4	34,7	308,6	1841,8	
	SFSDIPNPI	989,5	43,2	187,5	1361,4	
	VAPFPEV	758,4	38,2	313,5	688,9	
	VAPFPEVFG	962,5	56,0	1492,1	721,7	
	VPLGTQ	614,4	34,0	32,8	704,2	
	YFYPEL	831,4	30,8	172,3	370,6	AOx
	YQLDAYPS	956,4	32,2	133,0	954,9	
	YQLDAYPSGA	1084,5	50,4	32,8	1243,4	
	YTDAPSF	800,3	39,4	25,6	1497,4	
Caséine αs2	AINPSKENL	985,5	31,0	33,5	971,2	
	AVPITPT	698,4	26,0	62,7	604,5	
	ITVDDKH	827,4	33,5	239,6	-68,1	
	LYQGPIV	789,5	39,1	866,0	1325,8	
	NAVITPT	812,5	44,8	62,7	1307,7	
	NPWDQV	758,3	31,4	135,8	1210,3	
	VKITVDDK	917,5	42,0	1540,3	2433,0	
	VLNPWDQV	970,5	38,2	135,8	229,2	
	YQGPIVLN	903,5	34,5	62,7	1282,0	
	YQKFPQ	810,4	29,4	33,3	1282,1	
Caséine κ	ARHPPH	851,5	31,2	48,7	3058,6	
	EIPTINT	787,4	27,8	13,1	789,5	
	EQNQEQPI	985,5	38,0	187,5	2577,6	
	ESPPEIN	785,4	37,5	55,6	1841,2	

Protéine	Séquence	m/z	-10logP	ACE	DPPIV	MBPDB
				IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	
Caséine κ	ESPPEINT	886,4	49,3	13,1	1618,2	
	ESPPEINTV	985,5	40,1	287,7	2178,8	
	IASGEPTSTPT	1060,5	28,5	62,7	-101,2	
	IASGEPTSTPTTE	645,8	45,5	121,3	216,0	
	IESPPEIN	898,5	41,2	55,6	1400,6	
	IESPPEINT	999,5	46,1	13,1	1177,6	
	INNQFLPYP	921,5	24,4	52,7	1328,8	
	MAIPPK	656,4	27,0	422,2	246,0	
	NQDKTEIPTINT	687,3	35,7	13,1	2258,1	
	QFLPYPY	927,5	29,2	187,8	1575,5	
	SPAQIL	628,4	25,7	475,8	1631,6	
	SPAQILQ	756,4	33,9	111,4	1278,6	
	SRYPSTY	829,4	31,0	715,6	3042,9	
	TEIPTIN	787,4	32,2	55,6	2347,3	
	TEIPTINT	888,5	45,8	13,1	2124,4	
	VQVTSTAV	804,4	39,3	266,3	2228,9	
	YAKPAA	620,3	29,3	137,5	571,2	
	YPSYGLN	813,4	31,2	62,7	87,1	
	YQQKPVA	833,4	30,8	295,3	1306,2	
	YYQQKPVA	996,5	35,5	295,3	982,8	
α-lactalbumine	DDDLTDDIM	1052,4	39,4	341,0	3075,3	
	DLTDDIM	822,4	26,7	341,0	1469,0	
	FLDDDLTDD	1068,4	41,5	203,3	-735,4	
	GGVSLPEW	844,4	30,6	23,3	2674,0	
	GGVSLPEWV	943,5	31,5	1902,0	1954,7	
	ILDKVGIN	871,5	33,9	55,6	-298,3	
	LDDDLTD	806,3	28,9	55,0	1358,4	
	LDDDLTDD	921,4	33,9	203,3	1139,8	
	LDDDLTDDI	1034,5	39,0	684,1	1736,9	
	LDDDLTDDIM	1165,5	43,3	341,0	1891,2	
β-LGB	YGGVSLPEWV	1106,6	31,3	1902,0	144,6	
	EELKPTPEGDL	614,3	52,1	584,9	3038,3	
	EKFDDK	666,3	25,7	1540,3	3179,7	
	ELKPTPEGD	985,5	35,9	12,1	882,2	
	ELKPTPEGDL	1098,6	47,4	584,9	1339,4	
	GLDIQKVAGTW	594,3	39,4	21,4	2740,7	
	GLDIQKVAGTWY	675,9	46,5	1224,1	1841,9	
	ISLLDAQSAPL	1127,6	27,0	160,3	703,9	
	IVTQTM	692,4	30,7	113,3	156,9	
	KIDALNE	802,4	32,3	25,7	953,8	
	KPTPEGDL	856,4	34,0	584,9	1655,9	

Protéine	Séquence	m/z	-10logP	ACE	DPPIV	MBPDB
				IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	
β-LGB	LIVTQT	674,4	34,2	29,2	-522,8	
	LIVTQTM	805,4	46,5	113,3	204,6	
	LIVTQTMK	933,5	46,9	1059,7	-63,8	
	LIVTQTMKGLDIQK	794,5	52,2	196,4	-398,2	
	LKPTPEGD	856,4	28,0	12,1	1922,8	
	LKPTPEGDL	969,5	32,7	584,9	2380,0	DPP-IVi
	LKPTPEGDLE	732,7	31,5	411,5	2116,4	DPP-IVi
	LVLDTDY	838,4	42,3	685,2	365,8	
	MAASDI	607,3	23,7	684,1	615,7	
	PTPEGDL	728,3	28,3	584,9	2537,0	
	SFNPTQ	693,3	29,1	32,8	1429,5	
	SLAMAASDI	878,4	39,6	684,1	1139,1	
	SLAMAASDIS	965,5	47,5	394,8	846,0	
	SLAMAASDISL	1078,5	44,1	91,9	1502,7	
	SLAMAASDISLLDAQ	753,4	43,6	30,4	1347,9	
	SLAMAASDISLLDAQSAPL	937,5	37,3	160,3	1121,3	
	SLAMAASDISLLDAQSAPLRV	1065,1	62,8	2181,7	293,2	
	SLLDAQSAPL	1014,5	36,5	160,3	1121,3	
	TPEVDDEA	875,4	50,6	161,9	321,9	
	TPEVDDEAL	988,4	47,6	146,3	1546,2	
	TPEVDDEALEK	623,3	58,5	453,6	563,6	DPP-IVi, AM
	TPEVDDEALEKFDK	818,4	53,8	1540,3	759,8	
	VAGTWYSLAMAASDISL	878,4	38,0	91,9	1360,2	
	VEELKPT	815,4	23,5	62,7	1740,0	
	VEELKPTPEGD	607,3	60,8	12,1	1834,4	
	VEELKPTPEGDL	663,8	51,7	584,9	2291,7	
	VEELKPTPEGDLE	728,4	56,6	411,5	2028,0	
	VEELKPTPEGDLEI	784,9	48,9	201,5	2038,2	
	VEELKPTPEGDLEIL	841,4	36,5	475,8	2551,3	
	VLDTDY	725,3	36,6	685,2	659,2	ACEi, DPP-IVi
	VLVLDTD	774,4	32,7	55,0	157,0	
	VLVLDTDY	937,5	49,8	685,2	659,2	
	VRTPEVDD	930,5	32,9	203,3	2373,9	
	VRTPEVDDE	883,1	32,2	448,8	2575,2	
	VRTPEVDDEA	754,0	44,4	161,9	2238,5	
	VYVEELKPTPEGDLEI	916,0	55,2	201,5	1386,4	
	VYVEELKPTPEGDLEIL	972,5	48,6	475,8	1899,5	
	YVEELKPTPEGD	688,8	57,3	12,1	-76,3	
	YVEELKPTPEGDL	745,4	63,5	584,9	381,0	
	YVEELKPTPEGDLE	809,9	48,4	411,5	117,3	
	YVEELKPTPEGDLEI	866,4	39,3	201,5	127,5	

Protéine	Séquence	m/z	-10logP	ACE	DPPIV	MBPDB
				IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	
β-LGB	YVEELKPTPEGDLEIL	923,0	43,9	475,8	640,6	
Pepsine	AIVDTGTS	763,4	38,4	131,2	614,0	
	AIVDTGTSL	876,5	44,5	91,9	1311,7	
	DTVQVGGI	788,4	38,6	40,8	2285,0	
	FDNIWDQG	994,4	38,9	169,6	1036,5	
	FDNIWDQGLV	1005,7	51,0	976,1	1546,1	
	FDTGSSN	727,3	38,6	10,7	1284,4	
	FDTGSSNL	840,4	34,8	33,5	1491,3	
	FGLSETEPGS	1023,5	31,4	29,0	-145,7	
	FGTIGIGTPA	933,5	38,4	150,7	-401,6	
	GGISDTNQ	791,4	35,0	7,0	2110,8	
	GIGTPAQDF	905,4	41,6	162,9	2188,7	
	GILGYDTV	837,4	42,2	287,7	2090,2	
	GLSETEPGS	876,4	31,3	29,0	1666,8	
	GTGSMTGIL	836,4	26,5	475,8	3112,5	
	GTGSMTGILG	893,4	24,3	1219,6	2748,2	
	GTIGIGTPA	786,4	34,1	150,7	2184,2	
	GTIGIGTPAQD	1029,5	63,1	25,9	2003,7	
	GTPAQDF	735,3	42,2	162,9	3001,2	
	IGTPAQD	701,3	35,4	25,9	-511,7	
	QVGGISDTNQ	1018,5	59,7	7,0	1081,4	
	SIDSLPDI	859,4	26,8	684,1	1099,8	
	SIDSLPDIV	958,5	44,1	866,0	1248,0	
	SVEGYWQIT	1082,5	30,5	186,0	1090,9	
	VDGTSL	692,3	29,7	91,9	2505,5	
	VIFDTGSS	825,4	37,9	76,3	250,0	
	WILGDV	702,4	26,5	1064,6	-757,9	
	YLDTEY	803,3	30,4	201,8	139,7	
A0A140T8A9	IASGEPTSTPTIE	651,8	23,5	365,1	257,0	
	STPTIE	647,3	26,7	365,1	1776,2	
	STPTIEA	718,4	24,2	161,9	1179,7	
A4IFI0	ISDFYPGSVT	1085,5	30,5	122,8	562,2	
	SDFYPGSVT	972,4	36,6	122,8	2586,0	
	SVSGSLGQ	734,4	28,3	7,2	1222,2	
A5PJW4	ALVDTGTS	763,4	38,4	131,2	653,2	
	WLLGDV	702,4	26,5	1064,6	-718,6	
E1BHU3	VIVLDTD	774,4	32,7	55,0	117,8	
EPYC	DNNLDHIPLPL	630,8	35,4	160,3	2776,0	
	HIPLPL	689,4	24,5	160,3	665,4	
	TDNNLDHIPLPL	681,4	52,4	160,3	2467,5	
F1MC90	LLVTQT	674,4	34,2	29,2	-483,6	

Protéine	Séquence	m/z	-10logP	ACE	DPPIV	MBPDB
				IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	
F1MH27	AIDLDDFTGT	1067,5	37,9	13,6	725,9	
	SGAGPAGPY	776,4	37,4	187,8	1535,8	
F1MM81	AGPEAPFPGLP	1052,5	23,8	89,8	1737,2	
F1MWS3	VLFDTGSS	825,4	37,9	76,3	289,2	
F1N177	GPFPLL	643,4	24,6	536,3	2444,6	
F1N4I1	STPTLE	647,3	26,7	411,5	1705,9	
G3N0E0	ALVDTGTSL	876,5	44,5	91,9	1350,9	
G3N0V0	SYMPEPVT	923,4	27,1	122,8	2026,7	
GLCM1	ILNKPEDET	1058,5	35,9	67,3	-683,4	
J9UHS4	HNSLPQ	695,3	26,4	33,3	1901,0	
	HNSLPQNIPPLTQT	780,4	49,7	29,2	1587,4	
	VYPFPGPIHN	1140,6	63,9	20,5	1021,2	
	VYPFPGPIHNSLPQ	783,4	59,3	33,3	1282,1	
Q28157	DSITMDGET	968,4	40,2	67,3	1488,6	
	DSITMDGETI	1081,5	31,5	184,9	2322,8	
	TLDSITMDGET	985,6	40,1	67,3	263,4	
Q3MHH8	NVVDGQPF	875,4	38,3	44,6	1583,1	
Q5ZET1	EASPEVIESPEINT	806,4	38,0	13,1	1289,8	
SPT22	NPELPPLTKT	1109,6	26,3	308,6	613,0	
TKFC	SPAQLL	628,4	25,7	536,3	1561,4	

F 60b I2

Caséine β	AVPYPQ	674,3	30,3	33,3	798,3	
	DELQDKIHPF	621,3	36,4	44,6	3144,1	
	DMPIQ	619,3	27,3	98,8	1783,8	
	DMPIQ	603,3	28,7	98,8	1783,8	
	EAMAPK	662,3	34,2	422,2	1373,5	AM
	EELNVPGE	886,4	35,0	26,8	2782,4	
	EMPFPK	764,4	33,4	422,2	1347,4	ACEi, AM
	EPVLGP	611,3	24,8	5,8	1867,3	
	FPPQSV	674,4	32,7	167,3	232,2	
	GPFPII	643,4	26,3	556,4	2457,6	
	HKEMPFPK	844,8	38,4	422,2	2544,9	AM
	HLPLP	576,3	23,1	89,8	1124,2	ACEi
	HLPLPL	689,4	26,1	160,3	704,6	
	HQPHQPLPPT	959,8	46,4	62,7	1598,5	
	HQPHQPLPPTVM	691,4	35,6	225,1	2247,5	
	KAVPYPQ	802,4	38,4	33,3	1583,5	

Protéine	Séquence	m/z	-10logP	ACE	DPPIV	MBPDB
				IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	
Caséine β	KIHFP	641,4	29,4	44,6	1514,3	
	KVLPVPQ	780,5	28,6	33,3	1234,0	ACEi
	LHLPLP	689,4	25,4	89,8	1779,2	ACEi
	LHLPLPL	802,5	25,5	160,3	1359,6	ACEi
	LNVPGEIVE	969,5	31,5	241,0	1473,8	ACEi
	LTDVEN	690,3	30,6	20,1	217,5	
	LTDVENL	803,4	29,8	33,5	927,0	
	LTLTD	562,3	22,8	55,0	525,3	
	LVYFPGPPI	1002,6	53,5	187,5	167,0	ACEi
	LYQEPV	748,4	28,5	291,8	991,1	
	LYQEPVLG	918,5	41,4	1219,6	1130,2	
	MHQPHQPLPPT	641,8	57,6	62,7	907,1	
	MHQPHQPLPPTV	691,4	41,2	287,7	1508,6	
	MHQPHQPLPPTVM	756,9	48,9	225,1	1556,1	
	NIPPLTQT	883,5	43,8	29,2	687,7	
	NLHLPLP	803,5	28,4	89,8	1742,9	ACEi
	NLHLPLPL	916,6	40,8	160,3	1323,2	
	NVPGEI	628,3	24,4	201,5	1256,4	
	NVPGEIVE	856,4	29,5	241,0	1316,7	
	PEVMGV	647,3	32,3	63,5	3490,9	
	PEVMGVS	734,3	37,2	260,7	3112,6	
	PFPGPIN	838,4	41,2	18,7	1438,7	
	PFTESQ	708,3	29,5	19,1	2084,7	
	PFTESQS	795,4	37,8	61,9	1256,3	
	PGIPIN	594,3	22,8	18,7	1489,4	IM
	PPFLQPEV	926,5	24,7	313,5	1574,4	
	PQNIPPLT	879,5	28,2	209,7	2847,1	
	PQNIPPLTQT	1108,6	53,6	29,2	2462,8	
	PVEPF	588,3	27,1	44,6	1948,6	
	PVEPFT	689,4	35,0	256,5	1360,7	
	PVVVPPF	754,4	40,4	44,6	1948,6	
	PVVVPPFL	867,5	37,2	656,1	1837,3	
	PVVVPPFLQPE	814,8	40,0	123,0	1347,2	AM
	PVVVPPFLQPEV	660,9	59,3	313,5	1510,3	
	PVVVPPFLQPEVM	726,4	55,4	225,1	1972,6	
	PVVVPPFLQPEVM	734,4	65,8	225,1	1972,6	
	PVVVPPFLQPEVMG	762,9	67,7	915,2	1720,8	
	PVVVPPFLQPEVMGV	812,4	55,2	915,2	1720,8	
	PVVVPPFLQPEVMGVS	856,0	58,3	63,5	1903,6	
	PVVVPPFLQPEVMG	754,9	64,9	260,7	1525,2	
	PVVVPPFLQPEVMGVS	848,0	41,4	260,7	1525,2	

Protéine	Séquence	m/z	-10logP	ACE	DPPIV	MBPDB
				IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	
Caséine β	QEPVLGPV	838,5	37,4	291,8	2741,8	
	QPLPPTVM	882,5	30,0	225,1	1559,6	
	SLPQNIPPLT	1079,6	34,5	209,7	909,2	
	SLPQNIPPLTQT	654,9	44,9	29,2	524,9	
	SLVYFPFGPIPN	650,9	31,5	18,7	573,9	
	TDVENL	690,3	26,7	33,5	2508,4	
	TLTDVE	677,3	29,7	241,0	743,0	
	TLTDVEN	791,4	43,4	20,1	192,6	
	TLTDVENL	904,5	37,2	33,5	902,1	
	TPVVVPPF	855,5	38,4	44,6	1185,1	
	TPVVVPPFLQPEV	711,4	36,5	313,5	746,8	
	VENLHLPLPL	763,5	35,4	160,3	2216,6	
	VLPVPQ	652,4	22,7	33,3	235,0	
	VPPFLQPEV	1025,6	32,0	313,5	403,4	
	VPYPQ	603,3	26,9	33,3	410,6	AOx
	VVVPFLQPEV	816,1	30,9	313,5	339,4	
	VYFPFGPI	889,5	50,7	187,5	1507,6	
	VYFPFGPIPN	1100,6	60,4	18,7	1017,5	ACEi, AOx
	VYFPFGPIPNs	1187,6	65,9	27,8	995,8	
	WMHQPHQPLPPT	742,9	38,3	48,7	-536,3	
	WMHQPH	835,4	28,9	62,7	-666,4	
	WMHQPHQPLPPT	734,9	62,0	62,7	-666,4	
	WMHQPHQPLPPTVM	849,9	60,5	225,1	-17,5	
	YPFPFGPI	790,4	30,7	187,5	312,8	ACEi, IM
	YPVEPF	751,4	28,1	44,6	518,3	DPP-IVi
	YQEPV	635,3	25,8	291,8	1396,1	
	YQEPVLG	805,4	38,9	1219,6	1535,2	
	YQEPVLGPV	1001,5	46,4	291,8	1396,1	
Caséine αs1	APFPEV	659,3	30,7	313,5	855,2	
	AYFYPEL	902,4	33,1	172,3	1895,4	ACEi, AOx
	DAYPSGA	680,3	37,7	32,8	1436,4	
	EDVPSE	675,3	28,6	70,5	2799,1	
	EPMIGVN	775,4	28,8	63,5	1543,4	
	EPMIGV	645,3	27,7	36,7	1227,6	
	EPMIGVN	759,4	40,3	36,7	1227,6	
	FSDIPNPI	902,5	36,4	187,5	576,2	
	FVAPFPEV	905,5	26,5	313,5	-334,4	
	HPIKH	631,4	24,8	239,6	124,5	
	HQGLPQ	679,4	27,5	33,3	1792,3	
	HQGLPQE	808,4	34,9	57,2	1502,3	
	HQGLPQEV	907,5	47,1	313,5	1785,2	

Protéine	Séquence	m/z	-10logP	ACE	DPPIV	MBPDB
				IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	
Caséine αs1	IQKEDVPSE	1044,5	32,4	70,5	1213,2	
	KEGIHA	654,4	25,2	165,0	2514,1	
	MKEGIHA	785,4	34,0	165,0	1739,2	
	QGLPQEV	770,4	33,3	313,5	1269,8	
	QKEPM	632,3	25,4	114,9	3241,3	
	QKEPMIGVN	1015,5	26,2	36,7	3191,5	
	QLDAYPS	793,4	27,2	133,0	601,7	
	SDIPNPI	755,4	26,9	187,5	2670,4	
	SDIPNPIG	812,4	34,8	1081,9	2768,3	
	SDIPNPIGSEN	1142,5	52,3	20,1	2059,2	
	SDIPNPIGSENSEK	743,9	54,6	453,6	2254,5	AM
	SFSDIPNPI	989,5	49,2	187,5	1361,4	
	VAPFPEV	758,4	41,3	313,5	688,9	
	VAPFPEVFG	962,5	43,1	1492,1	721,7	
	VPLGTQ	614,3	29,2	32,8	704,2	
	YFYPEL	831,4	30,1	172,3	370,6	AOx
	YQLDAYPS	956,4	39,6	133,0	954,9	
	YQLDAYPSGA	1084,5	44,8	32,8	1243,4	
	YTDAPS	653,3	36,6	133,0	357,7	
	YTDAPSF	800,3	36,2	25,6	1497,4	
	YTDAPSFSDIPNPI	768,9	39,2	187,5	910,4	
Caséine αs2	AINPSKENL	985,5	40,8	33,5	971,2	
	ITVDDK	690,4	32,2	1540,3	410,7	
	ITVDDKH	827,4	36,1	239,6	-68,1	
	LYQGPIV	789,4	31,8	866,0	1325,8	
	NAVPITPT	812,5	39,6	62,7	1307,7	
	NPWDQV	758,3	27,7	135,8	1210,3	
	VKITVDDK	917,5	39,2	1540,3	2433,0	
	YQGPIV	676,4	29,8	866,0	1730,8	
	YQGPIVLN	903,5	33,7	62,7	1282,0	
	YQKFPQ	810,4	29,8	33,3	1282,1	
β-LGB	EELKPTPEGDL	678,8	35,9	411,5	2774,7	
	EKFDDK	666,3	28,6	1540,3	3179,7	
	EKFDDKA	737,4	26,2	742,0	2453,7	
	ELKPTPEGD	985,5	43,9	12,1	882,2	
	ELKPTPEGDL	1098,6	47,5	584,9	1339,4	
	ELKPTPEGDLE	614,3	35,2	411,5	1075,8	
	ELKPTPEGDLEI	670,8	38,1	201,5	1086,0	
	GLDIQK	673,4	24,1	196,4	1532,8	ACEi
	GLDIQKVAGTWYSLAMAASDI	1105,6	34,1	684,1	2022,3	
	IDALNE	674,3	27,3	25,7	1108,6	

Protéine	Séquence	m/z	-10logP	ACE	DPPIV	MBPDB
				IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	
β-LGB	ISLLDAQSAPL	1127,6	33,1	160,3	703,9	
	IVTQT	561,3	22,0	29,2	-570,4	
	IVTQTM	692,4	34,2	113,3	156,9	
	KIDALNE	802,4	40,5	25,7	953,8	
	KPTPEGDL	856,4	34,9	584,9	1655,9	
	LIVTQTM	805,5	45,9	113,3	204,6	
	LIVTQTM	821,4	39,8	113,3	204,6	
	LIVTQTMK	933,5	52,5	1059,7	-63,8	
	LKPTPEGDL	969,5	41,1	584,9	2380,0	DPP-IVi
	LKPTPEGDLE	915,6	32,2	411,5	2116,4	DPP-IVi
	LLDAQSAPL	927,5	28,5	160,3	112,8	
	LVLDTDY	838,4	35,7	685,2	365,8	
	MAASDI	607,3	23,0	684,1	615,7	
	PTPEGDL	728,3	27,3	584,9	2537,0	
	SFNPTQ	693,3	28,3	32,8	1429,5	
	SLAMAASD	765,3	36,9	32,0	848,3	
	SLAMAASDI	878,4	46,7	684,1	1139,1	
	SLAMAASDIS	965,5	43,2	394,8	846,0	
	SLAMAASDISLLDA	689,3	25,8	549,8	602,6	
	SLAMAASDISLLDAQSAPL	937,5	35,7	160,3	1121,3	
	SLAMAASDISLLDAQSAPLR	1015,5	66,4	1267,9	1222,8	
	SLAMAASDISLLDAQSAPLRV	1065,1	61,3	2181,7	293,2	
	TPEVDD	675,3	32,5	203,3	457,4	
	TPEVDDEA	875,4	53,0	161,9	321,9	
	TPEVDDEALEK	623,3	51,1	453,6	563,6	DPP-IV, AM
	TPEVDDEALEKFDK	818,4	42,5	1540,3	759,8	
	VAGTWYSLAMAASDISL	878,4	29,8	91,9	1360,2	
	VAGTWYSLAMAASDISLL	935,0	43,6	536,3	1243,3	
	VAGTWYSLAMAASDISLLDA	1028,0	31,9	549,8	460,2	
	VEELKPTPE	868,1	34,4	123,0	1763,5	
	VEELKPTPEGD	607,3	51,1	12,1	1834,4	
	VEELKPTPEGDL	663,8	51,3	584,9	2291,7	
	VEELKPTPEGDLE	728,4	61,6	411,5	2028,0	
	VEELKPTPEGDLEI	784,9	51,6	201,5	2038,2	
	VLDTDY	725,3	36,1	685,2	659,2	
	VLVLDT	659,4	27,4	228,7	116,2	
	VLVLDTD	774,4	32,3	55,0	157,0	
	VLVLDTDY	937,5	47,6	685,2	659,2	ACEi, DPP-IVi
	VLVLDTDYK	710,7	33,1	828,7	-54,1	DPP-IVi, AM
	VRTPEVDD	930,5	36,7	203,3	2373,9	
	VRTPEVDDE	706,7	41,4	448,8	2575,2	

Protéine	Séquence	m/z	-10logP	ACE	DPPIV	MBPDB
				IC ₅₀ (μ M)	IC ₅₀ (μ M)	
β -LGB	VRTPEVDDEA	565,8	40,5	161,9	2238,5	
	VTQTMK	707,4	26,6	1059,7	1153,7	
	VYVEELKPTPEGDL	794,9	50,0	584,9	1639,9	
	VYVEELKPTPEGDLEI	916,0	43,9	201,5	1386,4	
	VYVEELKPTPEGDLEIL	972,5	42,1	475,8	1899,5	
	YVEELKPTPEGD	688,8	48,4	12,1	-76,3	
	YVEELKPTPEGDL	745,4	46,9	584,9	381,0	
	YVEELKPTPEGDLE	809,9	30,7	411,5	117,3	
	YVEELKPTPEGDLEI	866,4	39,9	201,5	127,5	
	YVEELKPTPEGDLEIL	923,0	46,8	475,8	640,6	
Pepsine	AIVDTGT	676,4	25,2	13,6	725,9	
	AIVDTGTS	763,4	42,6	131,2	614,0	
	AIVDTGTSL	876,5	40,4	91,9	1311,7	
	DTGSSNL	693,3	30,7	33,5	2111,1	
	DTVQVGGI	788,4	37,2	40,8	2285,0	
	EGYWQIT	896,4	26,3	186,0	1470,6	
	FDNIWDQG	994,4	37,5	169,6	1036,5	
	FDNIWDQGLV	804,7	42,9	976,1	1546,1	
	FDTGSS	613,2	27,8	76,3	1221,8	
	FDTGSSN	727,3	44,2	10,7	1284,4	
	FDTGSSNL	840,4	42,8	33,5	1491,3	
	FGLSETEPGS	1023,5	25,4	29,0	-145,7	
	FGTIGIGTPA	933,5	38,7	150,7	-401,6	
	GGISDTNQ	791,4	36,4	7,0	2110,8	
	GGISDTNQI	904,4	34,1	87,2	2175,6	
	GIGTPAQDF	905,4	40,7	162,9	2188,7	
	GLAYPSIS	807,4	31,6	394,8	1729,3	
	GLSETEPGS	876,4	26,0	29,0	1666,8	
	GTGSMTGILG	893,4	35,1	1219,6	2748,2	
	GTIGIGTPA	786,4	34,8	150,7	2184,2	
	GTIGIGTPAQD	1029,5	54,8	25,9	2003,7	
	GTIGIGTPAQDF	784,7	39,2	162,9	3001,2	
	GTPAQDF	735,3	38,0	162,9	3001,2	
	IGTPAQD	701,3	36,9	25,9	-511,7	
	QVGGISDTN	890,4	53,1	18,5	1069,5	
	QVGGISDTNQ	1018,5	57,5	7,0	1081,4	
	SIDSLPDI	859,4	31,6	684,1	1099,8	
	SIDSLPDIV	958,5	49,0	866,0	1248,0	
	TVIFDTGSS	926,5	43,5	76,3	744,1	
	VDGTSL	692,3	26,9	91,9	2505,5	
	VGGISDTNQ	890,4	43,9	7,0	624,0	

Protéine	Séquence	m/z	-10logP	ACE	DPPIV	MBPDB
				IC ₅₀ (µM)	IC ₅₀ (µM)	
Pepsine	VIFDTGSS	825,4	36,1	76,3	250,0	
	YAPFDGILG	952,5	29,1	1219,6	625,8	
A0A0M3R7C5	EDSPEVIESPPEINT	828,4	35,3	13,1	2435,1	
	LEDSPEV	788,4	30,6	313,5	1521,7	
	TLEDSPEV	889,4	26,3	313,5	571,2	
A0A140T8A9	EQNQEQPI	985,5	33,7	187,5	2577,6	
	KYIPIQ	761,5	24,0	98,8	2504,2	
A1A4J4	ITLTD	562,3	22,8	55,0	326,9	
A5PJW4	ALVDTGT	676,4	25,2	13,6	765,1	
	ALVDTGTS	763,4	42,6	131,2	653,2	
E1B9Y2	ITITD	562,3	22,8	55,0	326,9	
E1BEZ1	SPAQLL	628,4	24,7	536,3	1561,4	
E1BHU3	VIVLDT	659,4	27,4	228,7	77,0	
	VIVLDTD	774,4	32,3	55,0	117,8	
E1BJE0	LVTQT	561,3	22,0	29,2	-372,0	
E7E1Q1	STPTIE	647,3	28,2	365,1	1776,2	
	STPTIEA	718,4	26,7	161,9	1179,7	
EPYC	DNNLDHIPLPL	630,8	38,6	160,3	2776,0	
	HIPLP	576,3	23,1	89,8	1085,0	
	HIPLPL	689,4	26,1	160,3	665,4	
	TDNNLDHIPLPL	681,4	48,0	160,3	2467,5	
F1ME93	KLHPF	641,4	29,4	44,6	1553,6	
F1MH27	AIDLDDFTGT	1067,5	46,7	13,6	725,9	
	NFGTAPF	753,4	27,8	44,6	1769,0	
	SGAGPAGPY	776,4	44,5	187,8	1535,8	
F1MLW7	ISDFYPGSVT	1085,5	35,6	122,8	562,2	
	SDFYPGSVT	972,4	36,2	122,8	2586,0	
	SVSGSLGQ	734,4	27,2	7,2	1222,2	
F1MPA5	DTGSSNI	693,3	30,7	39,2	2053,8	
F1MWS3	VLFDTGSS	825,4	36,1	76,3	289,2	
F1N440	HLPIP	576,3	23,1	79,7	1194,5	
G3N2I5	GPFPLL	643,4	26,3	536,3	2444,6	
G5E533	LDANE	674,3	27,3	25,7	1307,0	
GLCM1	ILNKPEDET	1058,5	34,4	67,3	-683,4	
J9UHS4	HNSLPQ	695,3	33,2	33,3	1901,0	
	HNSLPQNIPPLTQT	780,4	47,2	29,2	1587,4	
	VYPFPGPIHN	1140,6	52,0	20,5	1021,2	
	VYPFPGPIHNSLPQ	783,4	53,6	33,3	1282,1	
PD2R	LTITD	562,3	22,8	55,0	525,3	
Q28049	DDDLTDDIM	1052,4	39,7	341,0	3075,3	
	DLTDDIM	822,4	31,1	341,0	1469,0	
	FLDDDLTD	953,4	28,6	55,0	-516,8	

Protéine	Séquence	m/z	-10logP	ACE	DPPIV	MBPDB
				IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	
Q28049	FLDDDLTDD	1068,4	41,6	203,3	-735,4	
	GGVSLPEW	844,4	25,2	23,3	2674,0	
	GGVSLPEWV	943,5	32,8	1902,0	1954,7	
	ILDKVGIN	871,5	27,0	55,6	-298,3	
	IVQNNDSTE	1019,5	37,9	121,3	-133,5	
	LDDDLTDD	921,4	37,6	203,3	1139,8	
	LDDDLTDDI	1034,5	32,8	684,1	1736,9	
	LDDDLTDDIM	1165,5	45,2	341,0	1891,2	
Q28157	DSITMDGET	968,4	41,8	67,3	1488,6	
	DSITMDGETI	1081,5	31,4	184,9	2322,8	
	DSITMDGETIA	1152,5	33,1	447,2	1827,4	
Q2TA20	NPELPPLTKT	1109,6	28,4	308,6	613,0	
Q3MHH8	ALVFVDNHDNQR	714,4	41,1	176,4	686,8	
	IYVDAV	679,4	27,2	266,3	1302,1	
	NVVDGQPF	875,4	38,9	44,6	1583,1	
	SISNSAEDPF	1066,5	40,1	44,6	1230,4	
Q5ZET1	ARHPPH	851,4	32,8	48,7	3058,6	
	KTEIPTINT	1016,6	34,2	13,1	1742,8	
	YQQKPVA	833,5	30,8	295,3	1306,2	
	EASPEVIESPPEIN	755,9	31,6	55,6	1512,8	
	EIPTINT	787,4	38,6	13,1	789,5	
	ESPPEIN	785,4	37,0	55,6	1841,2	
	ESPPEINT	886,4	46,7	13,1	1618,2	
	ESPPEINTV	985,5	32,5	287,7	2178,8	
	FLPYPY	799,4	25,0	187,8	-89,6	
	HPHPH	624,3	30,0	48,7	533,8	
	IASGEPTSTPT	1060,5	34,9	62,7	-101,2	
	IASGEPTSTPTTE	645,8	32,9	121,3	216,0	
	IESPPEIN	898,5	43,6	55,6	1400,6	
	IESPPEINT	999,5	51,9	13,1	1177,6	
	LPYPY	652,3	24,0	187,8	354,8	
	MAIPPK	656,4	26,8	422,2	246,0	
	NQDKTEIPT	871,4	26,4	62,7	2217,1	
	NQDKTEIPTINT	687,3	38,3	13,1	2258,1	
	QFLPYPY	927,5	30,4	187,8	1575,5	
	SPAQIL	628,4	24,7	475,8	1631,6	
	SPAQILQ	756,4	28,8	111,4	1278,6	
	TEIPTIN	787,4	36,7	55,6	2347,3	
	TEIPTINT	888,5	47,3	13,1	2124,4	
	TIASGEPT	775,4	25,7	62,7	345,3	
	VIESPPEIN	997,5	39,3	55,6	265,9	
	VQVTSTAV	804,4	43,0	266,3	2228,9	

Protéine	Séquence	m/z	-10logP	ACE	DPPIV	MBPDB
				IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	
Q5ZET1	YPSYGLN	813,4	40,2	62,7	87,1	
	YYQQKPVA	996,5	34,1	295,3	982,8	
Q85PG9	TVLFDTGSS	926,5	43,5	76,3	744,1	
Q9TTV8	ALVDTGTSL	876,5	40,4	91,9	1350,9	