

Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique Leuconostoc pseudomesenteroides isolée du boza

Kahina Maya Makhloufi

▶ **To cite this version:**

Kahina Maya Makhloufi. Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique Leuconostoc pseudomesenteroides isolée du boza. Bactériologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2011. Français. NNT : . tel-00678029

HAL Id: tel-00678029

https://theses.hal.science/tel-00678029

Submitted on 11 Mar 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité : Microbiologie, Biochimie

(Ecole doctorale iViv)

Présentée par

Kahina Maya MAKHLOUFI

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza

Soutenue le 8 juillet 2011

devant le jury composé de :

Sylvie REBUFFAT	Professeur, MNHN	Directeur de thèse
Mohamed AMICHE	Chargé de recherche, CNRS	Rapporteur
Djamel DRIDER	Maître de conférences, ONIRIS	Rapporteur
Ali LADRAM	Maître de conférences, Université Paris 6	Examinateur
Germain TRUGNAN	Professeur, Université Paris 6	Examinateur

A mes parents,

A ma sœur,

A tous ceux qui m'ont soutenue et épaulée

Remerciements

Cette étude a été réalisée dans l'unité « Molécules de Communication et Adaptation des microorganismes », UMR 7245 CNRS-MNHN dirigée par le Professeur Sylvie Rebuffat. Je tiens à lui adresser mes remerciements pour m'avoir permis de réaliser ces travaux au sein de son unité.

*Je remercie vivement Monsieur **Mohamed Amiche**, Chargé de Recherche au CNRS (Laboratoire de Recherche sur la Croissance Cellulaire, la Réparation et la Régénération Tissulaires (CRRET)) et Monsieur **Djamel Drider**, Maître de Conférences à l'ONIRIS (Unité de Microbiologie Alimentaire et Industrielle, Nantes) de m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail et d'en d'être les rapporteurs. Je tiens à remercier Monsieur **Ali Ladram**, Maître de Conférences à l'université Paris VI, d'avoir accepté de faire partie de ce jury et de m'avoir accompagnée pendant ma thèse. Je tiens également à adresser mes remeciements à Monsieur **Germain Trugnan**, Professeur à Paris VI et Directeur de l'Ecole Doctorale i-Viv, de m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse. Je le remercie également pour la confiance et la disponibilité qu'il m'a accordées depuis le début de ma thèse.*

*Au terme de ce doctorat, je tiens à remercier vivement ma directrice de thèse Madame **Sylvie Rebuffat**, pour avoir accepté de m'accueillir au sein de son laboratoire et d'avoir dirigé ce travail de thèse, ainsi que pour avoir soutenu ma participation à de nombreux congrès internationaux. Je la remercie également pour la disponibilité et la patience qu'elle a eues à mon égard.*

*Mes vifs remerciements s'adressent à Monsieur **Jean Peduzzi** pour avoir suivi ce travail tout au long de la thèse et de m'avoir transmis ses connaissances et fait part de son expérience en biochimie. Je le remercie également pour m'avoir toujours accordé son temps et avoir veillé au bon déroulement de ce travail. Mes vifs remerciements s'adressent aussi à Madame **Alyssa Carré-Mlouka** pour m'avoir transmis ses connaissances en microbiologie et en biologie moléculaire et aussi pour sa patience et sa disponibilité.*

*Je remercie Madame **Carine Lombard** pour son soutien, sa patience, sa présence pendant les bons et les mauvais moments ainsi que pour sa disponibilité et sa gentillesse. Elle est devenue après ces années une amie pour moi. Je la remercie également d'avoir contribué à ces travaux de recherche et de m'avoir fait part de son expérience en purification et en spectrométrie de masse et pour tous les conseils scientifiques dont elle m'a fait part. Je souhaite remercier également Madame **Séverine Zirah** pour sa disponibilité, ses conseils scientifiques et sa gentillesse ainsi que pour sa contribution à ces travaux de recherches notamment aux expériences de spectrométrie de masse.*

*Je souhaite évidemment remercier Madame **Manon Vandervennet** pour son aide quotidienne notamment à la préparation des milieux bactériologiques et autres ainsi que pour sa bonne humeur et sa sympathie. Je tiens également à remercier Monsieur **Gérard Gastine** pour son aide en bactériologie et sa sympathie.*

*Je remercie également Monsieur **Grégory Martino** pour sa bonne humeur quotidienne et communicative, sa sympathie et son soutien.*

*J'exprime mes remerciements également à Messieurs **Arul Marie** et **Lionel Dubost** pour la réalisation des spectres de masse ainsi que pour leur aide et leurs conseils scientifiques en spectrométrie de masse.*

*Mes remerciements s'adressent également aux personnes avec lesquelles j'ai collaboré au cours de cette étude et en particulier à Monsieur **Leon Dicks**, Professeur à l'Université de Stellenbosh en Afrique du Sud pour avoir initié et permis cette collaboration. Je tiens à remercier également Madame **Carol van Reenen**, Chercheur à l'Université de Stellenbosh en Afrique du Sud pour avoir donné de son temps et contribué aux manipulations de purifications du peptide d'intérêt.*

*Je souhaite aussi remercier Monsieur **Yann Héchard**, Professeur à l'Université de Poitiers, pour m'avoir aimablement envoyée la souche de* Listeria *mutée, ce qui m'a permis de compléter et de valoriser mon travail.*

*Je remercie également l'équipe de l'unité de biophysique du Muséum National d'Histoire Naturelle pour m'avoir permis de réaliser l'électrophorèse en champ pulsé et en particulier Madame **Delphine Trochet**.*

*Je remercie Monsieur **Jacques d'Alayer** responsable de la Plate-Forme d'Analyse et de Microséquençage des protéines à l'Institut Pasteur pour la réalisation du séquençage peptidique.*

*Je tiens à remercier chaleureusement tous les membres du laboratoire en particulier Madame **Catherine Pougault** et Monsieur **Brice Molinelli** pour leur aide administrativeet amicale ainsi que tous les **membres du laboratoire** qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail et ont permis la concrétisation et la valorisation d'une véritable expérience à la fois professionnelle et humaine.*

*Enfin, je remercie ceux qui ont veillé sur moi depuis toujours, ceux qui m'ont fait confiance, qui m'ont soutenue sans faille dans tous mes projets et qui ont toujours accepté mes choix, merci à **mes parents** et à **ma sœur**. Merci à mes amis pour leur présence et leur soutien et en particulier à **Sana**.*

Sommaire

Introduction générale **1**

Chapitre I : Les bactériocines produites par les bactéries à Gram positif. Origine, diversité et rôle dans la bioconservation

I. Les bactéries lactiques **3**

I.1. Généralités sur les bactéries lactiques **3**

I.2. Habitat **5**

I.2.1. Culture des bactéries lactiques 5

I.2.2. Présence des bactéries à l'état libre dans l'environnement 6

I.2.3. Présence des bactéries lactiques en association avec un hôte 6

I.3. Les fermentations **7**

I.3.1. Définition des fermentations 7

I.3.2. Les fermentations lactiques 9

I.4. Diversité et taxonomie **10**

I.4.1. Origine des bactéries lactiques 10

I.4.2. Diversité des bactéries lactiques 10

I.4.3. Taxonomie des bactéries lactiques 11

I.5. Utilisation des bactéries lactiques **12**

I.5.1. Utilisation des bactéries lactiques productrices de bactériocine(s) 12

I.5.2. Notion d'un probiotique 14

a. Définition d'un probiotique 14

b. Rôle du probiotique 15

c. Applications des probiotiques 16

- Traitement des diarrhées 17
- Traitements gastriques 17

II. Les peptides antimicrobiens produits par les bactéries à Gram positif **18**

II.1. Définitions, généralités **18**

II.2. Classification **19**

III. Les bactériocines de classes I : les lantibiotiques **21**

III.1. Structure **22**

III.2. Biosynthèse **25**

III.3. Mode d'action **33**

III.3.1. Le double mécanisme d'action 34

III.3.2. Inhibition de synthèse de la paroi bactérienne 37

IV. Les bactériocines de classe II **37**

IV.1. La classe IIa 37
IV.1.1. Structures tridimensionnelles 41
IV.1.2. Biosynthèse et régulation 43
a. Biosynthèse 44
b. Régulation 45
IV.1.3. Mode d'action et immunité 46
a. Mode d'action 46
b. Immunité 49

IV.2. La classe IIb 52
IV.2.1. Structure 53
IV.2.2. Biosynthèse et régulation 56
a. Biosynthèse 57
b. Régulation 58
IV.2.3. Mécanisme d'action et immunité 61
a. Mécanisme d'action 61
b. Immunité 62

IV.3. La classe IIc : les bactériocines circulaires 62
IV.3.1. Structure 63
IV.3.2. Biosynthèse 66
IV.3.3. Mécanisme d'action et immunité 68
a. Mécanisme d'action 68
b. Mécanisme d'immunité 69

IV.4. La classe IId : les bactériocines linéaires, non modifiées, non « pediocin-like » 70
IV.4.1. Les différentes bactériocines de classe IId 70
a. Bactériocines sécrétées via le système Sec 70
b. Bactériocines dépourvues de peptide « leader » et de séquence signal (« leaderless ») 71
- Bactériocines produites par des bactéries du genre *Enterococcus* 71
- Bactériocines produites par des bactéries du genre *Staphylococcus* 73
- Bactériocines produites par des bactéries du genre *Lactobacillus* 73

c. Bactériocines « autres » 73
- La lactococcine A et les bactériocines homologues 73
- L'entérocine B et les bactériocines homologues 74

IV.4.2. Mode d'action 75
a. La lactococcine A 75
b. La lactococcine 972 75
c. La lacticine Q 76

V. Les applications des bactériocines 76

V.1. Les bactériocines en agroalimentaire 76
V.1.1. Applications 79
V.1.2. Conditionnements 80

V.2. Les applications médicales des bactériocines 81
V.2.1. Applications 82
a. Traitements d'infections cutanées 82
b. Traitements de la gingivite 82
c. Traitements de la mastite 83
d. Traitements de l'otite 83
e. Traitements d'infections systémiques 84
f. Traitements d'infections urogénitales et contraception 84

V.2.2. Conditionnements 85

V.3. Limites d'utilisations des bactériocines 86

Matériels et méthodes

I. Méthodes bactériologiques 87

I.1. Souches et plasmides 87
I.1.1. Souches bactériennes 87
I.1.2. Plasmides 88

I.2. Milieux de culture 90
I.2.1. Milieux liquides 90
I.2.2. Milieux gélosés 91
I.2.3. Antibiotiques 91

I.3. Identification bactérienne 91
I.3.1. Coloration Gram 91
I.3.2. Galerie API 92

I.4. Activité antibactérienne 93
I.4.1. Tests en milieu solide 93
I.4.2. Tests en milieu liquide 93
I.4.3. Effet de la leucocine KM432Bz sur la croissance bactérienne 94

I.5. Biofilms 94
I.5.1. Formation de biofilms 94
I.5.2. Effet de la leucocine KM432Bz sur la faisabilité des biofilms 95
I.5.3. Effet de la leucocine KM432Bz sur des biofilms 95

II. Méthodes de biologie moléculaire 96

II.1. Manipulation d'ADN 96
II.1.1. Purification 96
a. Extraction d'ADN génomique 96
b. Extraction d'ADN plasmidique 96
- Bactéries à Gram négatif 96
- Bactéries à Gram positif 97

II.1.2. Dosage d'ADN 97
a. Au spectrophotomètre 97
b. Sur gel d'agarose 97
II.1.3. Digestions 98

II.2. Amplification d'ADN 98
II.2.1. Réaction de PCR (Polymerase Chain Reaction) 99
II.2.2. Electrophorèse sur gel d'agarose 100
a. Champ continu 100
b. Champ pulsé 100
II.2.3. Interaction sonde-ADN 101
a. Transfert sur membrane Hybond 101
- "Southern Blot" 101
- "Dot Blot" : 102

b. Marquage de la sonde à la digoxygénine-11-dUTP (DIG-11dUTP) 102
c. Hybridation 103

d. Détection et révélation du signal 103
e. Déshybridation et conservation de la membrane 104
- Déshybridation thermique 104
- Déshybridation chimique 104

II.3. Clonages 105
II.3.1. Préparation des inserts d'ADN 105
II.3.2. Préparation des vecteurs 105
a. Digestion 105
b. Déphosphorylation 105
II.3.3. Ligation (conditions) 106
a. pGEM®-T Easy 106
b. pBR322 107
II.3.4. Préparation de cellules compétentes 107
II.3.5. Transformation 107
II.3.6. Sélection des clones 108

II.4. Séquençage 108

III. Production et purification de la bactériocine KM432Bz 108

III.1. Culture de la souche KM432Bz 108

III.2. Purification de la bactériocine KM432Bz 108
III.2.1. Préparation et traitement du surnageant de culture 108
III.2.2. Précipitation au sulfate d'ammonium et dialyse 109
III.2.3. Extraction en phase solide sur cartouche C_{18} (35CC) 109
III.2.4. Purification par chromatographie liquide haute performance (C18Inertsil ODS2) 109

IV. Caractérisation de la bactériocine KM432Bz 110

IV.1. Dosage de la bactériocine KM432Bz 110
IV.1.1. Dosage de Bradford 110
IV.1.2. Absorbance à 280 nm 110

IV.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS Tris-tricine (SDS-PAGE) 110
IV.2.1. Préparation du gel et des échantillons 111
IV.2.2. Colorations 111
a. **Au bleu de Coomassie G-250** (principe présenté dans le paragragraphe IV.1.a) 111
b. Au nitrate d'argent 112
IV.2.3. Détection d'activité antibactérienne sur gel (gel overlay) 112

IV.3. Spectrométrie de masse 112
IV.3.1. MALDI-TOF 113
IV.3.2. ESI-qTOF 113

IV.4. Détermination de la séquence peptidique 114
IV.4.1. Réduction et alkylation 114
IV.4.2. Digestions enzymatiques 114
IV.4.3. Séquençage par dégradation d'Edman 114
a. Purification du peptide réduit et alkylé par CLHP 115
b. Dégradation d'Edman 115
IV.4.4. Séquençage par spectrométrie de masse (LC-MS/MS) 115

Chapitre II : Caractérisation d'une bactériocine produite par une souche de *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza

I. Publication **121**

II. Synthèse des résultats **150**

II.1. Identification de la souche productrice KM432Bz **150**

II.2. Caractérisation de la bactériocine KM432Bz **150**

II.3. Caractérisation du cluster de gènes impliqué dans la biosynthèse de la leucocine KM432Bz **151**

II.4. Spectre d'activité de la leucocine KM432Bz **156**

III. Résultats complémentaires **157**

III.1. Caractérisation de la bactériocine KM432Bz **157**

III.2. Implication de EII^{t}_{Man} dans le mode d'action de la leucocine KM432Bz **158**

III.3. Effet de la leucocine KM432Bz sur des biofilms **159**

a. Effet de la leucocine KM432Bz sur la formation d'un biofilm 160

b. Effet de la leucocine KM432Bz sur un biofilm préformé 160

III.4. Recherche du gène codant le précurseur de la leucocine KM432Bz chez autres espèces de *Leuconostoc* **161**

Discussion générale, conclusions et perspectives 164

Bibliographies 169

Liste des abréviations

ABC	« ATP-Binding Cassette », Cassette liant l'ATP
Abu	Acide α-aminobutyrique
ACN	Acétonitrile
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
Amp^R	Résistant à l'ampicilline
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
ATTC	« American type culture collection »
Aur	Auréocine
B. subtilis	*Bacillus subtilis*
BET	Bromure d'ethidium
BHI	Brain heart infusion
Bp	Paires de bases
BSA	« Bovine serum albumine », Albumine de sérum bovin
Bvi	Butyrivibriocine
By. fibrisolvens	*Butyrivibrio fibrisolvens*
Cb. maltaromaticum	*Carnobacterium maltaromaticum*
Cb. piscicola	*Carnobacterium piscicola*
Cbn	Carnobactériocine
Ccl	Carnocycline
Cl. beijerinckii	*Clostridium beijerinskii*
Cl. botulinum	*Clostridium botulinum*
Cl. tyrobutyricum	*Clostridium tyrobutyricum*
CID	« Collision-induced dissociation », Dissociation induite par collision
CIP	Collection de l'institut Pasteur
Cir	Circularine
CLHP	Chromatoghraphie en phase liquide à haute performance
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CSPD	Disodium 2-chloro-5-(4-methoxyspiro [1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1(3,7)] decan]-4-yl)-1-phenyl phosphate
Da	Dalton
DAP	Acide diaminopimélique
DEAE	Diethylaminoethyle
Dha	Didéshydroalanine
Dhb	2, 3-Didéshydrobutyrine
DIG	Digoxygénine
Div	Divergicine
dNTP	désoxynucléotide triphosphate
DO	Densité optique
DPC	Dodécylphosphocholine
DPCe	« Data processing center »
DSMZ	« Deutsche sammlung von mikroorganismen und zellkulturen GmbH»,

	Collection allemande de cultures cellulaires et de microorganismes
DTT	Dithiothréitol
Dur	Durancine
dUTP	déoxyuridine triphosphate
Dvn	Divercine
E. coli	*Escherchia coli*
En. faecalis	*Enterococcus faecalis*
En. faecium	*Enterococcus faecium*
EII^{t}_{Man}	Mannose perméase du système phosphotransférase
EDTA	Ethylène diamine tétra-acétate
EFFCA	« European food and feed cultures association », Association européenne pour l'alimentation et les cultures bactériennes destinées à l'alimentation
EFSA	« European food safety authority », Autorité européenne de sécurité des aliments
EMEA	« European medicines agency », Agence européenne des médicaments
Ent	Entérocine
Epi	Epidermine
ESI	« Electrospray ionization », Ionisation par électronébulisation
FAD/ $FADH_2$	Coenzyme d'oxydoréduction flavine adénine dinucléotide
FAO	« Food and agriculture organization », Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
FD	Forme dimérique
FDA	« Food and drug administration », Agence Fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux
FMN/ $FMNH_2$	Coenzyme d'oxydoréduction flavine mononucléotide
Gass	Gasséricine
GlcNAc	N-Acétylglucosamine
GRAS	« Generally recognized as safe », Reconnu comme sain
HACCP	« Hazard analysis and critical control point », Système d'analyse des dangers - points critiques pour leur maîtrise
HCCA	Acide α-cyano-4-hydrocinamique
HPH	Hautes pressions hydrostatiques
IC_{50}	« Half maximal inhibitory concentration », Concentration maximale inhibitrice à 50 %
Im	Immunité
IPTG	Isopropyl β-D-1 thiogalactopyranoside
IS	« Insertion sequences », Séquences d'insertion
IUPAC	« International union of pure and applied chemistry », Union internationale de chimie pure et appliquée
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
Lac	Lactocycline
Lag	Lactococcine G
Lan	Lantibiotique

λ	Longueur d'onde
LB	Luria Bertani
Lb. acidophilus	*Lactobacillus acidophilus*
Lb. bugaricus	*Lactobacillus bulgaricus*
Lb. casei	*Lactobacillus casei*
Lb. delbrueckii	*Lactobacillus delbrueckii*
Lb. fermentum	*Lactobacillus fermentum*
Lb. gasseri	*Lactobacillus gasseri*
Lb. lactis	*Lactobacillus lactis*
Lb. plantarum	*Lactobacillus plantarum*
Lb. reuteri	*Lactobacillus reuteri*
Lb. rhamnosus	*Lactobacillus rhamnosus*
Lb. sakei	*Lactobacillus sakei*
Lc. garvieae	*Lactococcus garvieae*
Lc. lactis	*Lactococcus lactis*
Lca	Système génétique de la leucocine A
Lcn	Lactococcine
Li. innocua	*Listeria innocua*
Li. monocytogenes	*Listeria monocytogenes*
Ln. carnosum	*Leuconostoc carnosum*
Ln. gelidum	*Leuconostoc gelidum*
Ln. mesenteroides	*Leuconostoc mesenteroides*
Ln. pseudomesenteroides	*Leuconostoc pseudomesenteroides*
Lnq	Lacticine
LPS	Lipopolysaccharide
Ltn	Lacticine
MALDI-TOF	« Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization, Time-Of-Flight» Ioinisation par dsorption de lumière assistée par matrice, temps de vol
Mb	Mégabase
MBP	« Maltose Binding Protein », Protéine de sécrétion du maltose
Mes	Mésentéricine
MET	Microscope électronique à transmission
Mrs	Mersacidine
MRS	De Man Rogosa Sharpe
MS	« Mass Spectrometry », Spectrométrie de masse
MurNAc	Acide N-Acétylmuramique
NAD^+/ NADH, H^+	Coenzyme d'oxydoréduction nicotinamide adénine dinucléotide
NCBI	« National Center for Biotechnology Information »
Nis	Nisine
NRPS	« Non ribosomal peptides synthetase »
Nuk	Nukacine
OMS	Organisation mondiale pour la santé publique
ONUAA	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
QPS	« Qualified presumption of safety », Présomption de sécurité qualifiée
Pap	Système génétique de la pédiocine
PCR	« Polymerase chain reaction »

Pct	Propionicine
PDB	« Protein data bank »
PE	Phophatidylethanolamine
Ped	Pédiocine
φ	Phi
PHK	Protéine histidine kinase
Pi	Phosphate inorganique
PITC	Phénylisothiocyanate
PLA	« Polylactic acid », Acide polylactique
Pln	Plantaricine
PR	Protéine régulatrice
Ψ	Psi
Psi	Piscicoline
PTC	Phénylthiocarbamyle
PTH	Phénylthiohydantoïne
PVDF	« Polyvinylidene fluoride », Polyfluorure de vinylidène
QPS	« Qualified presumption of safety », Présomption de sécurité qualifiée
RMN	Résonance magnétique nucléaire
Rpm	« Revolutions per minute », Tours par minute
SARM	*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline
SDS	« Sodium dodecyl sulfate », Dodécyl sulfate de sodium
SLP	Système de lactoperoxidase
SSC	« Sodium Citrate », Citrate de sodium
Subsp.	« Subspecies », Sous-espèce
Sta. aureus	*Staphylococcus aureus*
Sta. epidermis	*Staphylococcus epidermis*
STPP	« Sodium tripolyphosphate », Tripolyphosphate de sodium
Str. agalcatiae	*Streptococcus agalactiae*
Str. salivarius	*Streptococcus salivarius*
Str. thermophilus	*Streptococcus thermophilus*
Str. uberis	*Streptococcus uberis*
TA	Température ambiante
TAE	Tris acétate EDTA
Taq	Taq polymérase
TBE	Tris borate EDTA
Tet^R	Résistant à la tétracycline
TFA	« Trifluoroacetic acide », Acide trifluoroacétique
TFE	Trifluoroéthanol
Thm	Thermophiline
Tm	« melting temperature », Température d'hybridation
TSYE	Trypticase soy yeast extract
Ubér	Ubérolysine
UE	Unité enzymatique
UV	Ultraviolet
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside

A	Ala	Alanine	**M**	Met	Méthionine
C	Cys	Cystéine	**N**	Asn	Asparagine
D	Asp	Acide aspartique	**P**	Pro	Proline
E	Glu	Acide glutamique	**Q**	Gln	Glutamine
F	Phe	Phénylalanine	**R**	Arg	Arginine
G	Gly	Glycine	**S**	Ser	Sérine
H	His	Histidine	**T**	Thr	Thréonine
I	Ile	Isoleucine	**V**	Val	Valine
K	Lys	Lysine	**W**	Trp	Tryptophane
L	Leu	Leucine	**Y**	Tyr	Tyrosine

Symboles des acides aminés d'après la commission IUPAC-IUB sur la nomenclature biochimique.

A	Adénine
C	Cytosine
G	Guanine
T (U)	Thymine (Uracile)

Symboles des nucléotides d'après la commission IUPAC-IUB.

Liste des figures et tableaux

		Pages
Figure I. 1. a	*Lactobacillus* Rosell-11 observé au microscope électronique à transmission (M.E.T.) (x 10000).	3
Figure I. 1. b	*Leuconostoc lactis* observé au M.E.T. (x 10000).	3
Figure I. 2	Représentation schématique des principales voies de fermentation des hexoses chez les bactéries lactiques.	8
Figure I. 3	Arbre phylogénique des bactéries lactiques d'après Axelsson, 2004	11
Figure I. 4	Produits laitiers commercialisés fabriqués à partir de bactéries considérées comme probiotiques.	16
Figure I. 5	Structures des résidus modifiés communs aux lantibiotiques et résultant de modifications post-traductionnelles.	21
Figure I. 6. a	Structures de lantibiotiques de type A I.	22
Figure I. 6. b	Structures de lantibiotiques de type A II.	23
Figure I. 7	Structures de lantibiotiques de type B.	24
Figure I. 8	Structure d'un lantibiotique « two-peptides » : la lacticine 3147.	24
Figure I. 9	Structure d'un lantibiotique non classé possédant deux ponts disulfure : la sublancine 168.	25
Figure I. 10	Organisation génétique des clusters de gènes impliqués dans la biosynthèse et la régulation de la biosynthèse des lantibiotiques.	26
Figure I. 11	Voies de modifications post-traductionnelles et d'export d'un lantibiotique de type A I : la nisine.	27
Figure I. 12	Voies de modifications post-traductionnelles et d'export d'un lantibiotique de type A II : la nukacine ISK-1.	28
Figure I. 13	Décarboxylation oxydative d'une cystéine en aminoenthiol/ aminoenthiolate lors de la biosynthèse de la mersacidine et de l'épidermine.	29
Figure I. 14	Schéma de biosynthèse, de sa régulation et d'immunité de la souche productrice pour la nisine.	30
Figure I. 15	Structure du lipide II.	35
Figure I. 16	Formation de pores membranaires par le complexe nisine-lipide II selon Chatterjee C. *et al.*	36
Figure I. 17	Alignement de séquences peptidiques de bactériocines de classe IIa d'après Nissen-Meyer J. *et al.*	40
Figure I. 18	Structures tridimensionnelles de quelques bactériocines de classe IIa.	41
Figure I. 19	Schéma de la structure et l'orientation de deux bactériocines des sous-groupes 1/ 2 et 3 (*p.41*) dans la membrane plasmique de la bactérie cible d'après Nissen-Meyer J. *et al.*	42
Figure I. 20	Organisation génétique des clusters de gènes impliqués dans la biosynthèse, le transport et la régulation de la biosynthèse des bactériocines de classe IIa d'après Ennahar S. *et al.*	44
Figure I. 21	Schéma de la biosynthèse, la régulation de la biosynthèse et l'immunité des bactériocines de classe IIa.	46
Figure I. 22	Structure de la mannose perméase du système phosphotransférase EII^{t}_{Man} d'après Diep D.B. *et al.*	48

Figure I. 23	Mode d'action des bactériocines de classe IIa et par les lactococcines A et B (classe IId) d'après Diep D.B. *et al.*	49
Figure I. 24	Alignement de séquences peptidiques de cinq protéines d'immunité de cinq bactériocines de classe IIa du groupe A (PedB-PA, PedB-PP et EntA-im), du groupe B (PsiI) et du groupe C (ImB2).	50
Figure I. 25	Structures tridimensionnelles des protéines d'immunité de la carnobactériocine B2 (ImB2), de l'entérocine A (EntA-im), de la pédiocine PP-1 (PedB-PP) et de la piscicoline 126 (PsiI).	51
Figure I. 26	Modèle d'interaction de la protéine d'immunité avec la mannose perméase phosphotranférase EII^{t}_{Man} pour les bactériocines de classe IIa et certaines bactériocines de classe IId (lactococcines A et B) proposé par Diep D. B.*et al.*	52
Figure I. 27	Séquences en acides aminés de bactériocines de classe IIb.	54
Figure I. 28	Structures tridimensionnelles de la lactococcine G et des plantaricines EF et JK en contact avec des micelles.	55
Figure I. 29	Modèle de la représentation structurale des deux peptides constituant la lactococcine G et de leur orientation dans la membrane des bactéries cibles d'après Oppegård C.*et al*.	56
Figure I. 30	Organisation génétique des clusters de gènes impliqués dans la biosynthèse, le transport et la régulation des bactériocines de classe IIb produites par *Lb. plantarum* (NC11 et NC8) et *Lc. lactis* (LMGT 2081 et QUA) d'après. Diep D. B *et al.*	57
Figure I. 31	Schéma de la biosynthèse et la régulation de la production des bactériocines « two-peptides » chez *Lb. plantarum* C11.	59
Figure I. 32	Séquence en acides aminés et structure tridimensionnelle de la plantaricine A (PDB : 1YTR).	60
Figure I. 33	Alignement de séquences des bactériocines circulaires de classe IIc d'après Martin-Visscher L.A. *et al*.	61
Figure I. 34	Structure secondaire de l'entérocine AS-48.	64
Figure I. 35	Structures tridimensionnelles de la carnocycline A et des formes monomérique et dimérique (FD-II) de l'entérocine AS-48.	66
Figure I. 36	Organisation génétique des clusters de gènes impliqués dans la biosynthèse et la régulation de la production de deux bactériocines circulaires : l'entérocine AS-48 (*as-48*) et la butyrivibriocine AR10 (*bvi*).	67
Figure I. 37	Voie de maturation de l'entérocine AS-48.	68
Figure I. 38	Représentation schématique du mode d'action de l'entérocine AS-48 d'après Sánchez-Barrena M. J. *et al.*	69
Figure I. 39	Alignement de séquences peptidiques des bactériocines de classe IId sécrétées via la voie Sec.	71
Figure I. 40	Alignement de séquences peptidiques des bactériocines de classe IId dépourvues de peptide leader et de séquence signal	72
Figure I. 41	Alignement de séquences peptidiques des bactériocines de classe IId « autres ».	74
Figure I. 42	Représentation schématique de la formation de pores toroïdes par la lacticine Q d'après Yoneyama, F. *et al.*	76
Figure I. 43	Nisaplin™.	79
Figure I. 44	BLIS K12™ .	83
Figure M. 1	Vecteur pBR322 (*E. coli* K12 RYC 1000).	89
Figure M. 2	Vecteur pGEM®-T Easy (*Promega*).	89

Figure M. 3	Montage du transfert d'acides nucléiques sur membrane Hybond^{TM}-N^{+}.	102
Figure M. 4	Digoxygénine-11dUTP (DIG-11 dUTP).	103
Figure M. 5	Déphosphorylation du CSPD par la phosphatase alcaline (« DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II » (*Roche*)).	104
Figure II. 1. a	Le boza.	116
Figure II. 1. b	La région des Balkans.	116
Figure II. 2	Alignement de séquences peptidiques des bactériocines produites par *Leuconostoc* sp.	120
Figure II. 3	Alignement des séquences nucléotidiques des clusters de gène impliqués dans la biosynthèse des leucocines A (immunité et précurseur : Genbank M64371.1, ABC : Genbank L40491.1), B (Genbank S72922.1), A-QU15 (Genbank AB499610) et de la leucocine KM432Bz (Genbank xxx).	156
Figure II. 4	Electrophorèse Tris-tricine-SDS de la leucocine KM432Bz.	158
Figure II. 5	Tests antimicrobiens de la leucocine KM432Bz (5 µl , 10 µM) sur *Li. monocytogenes* EGDE *rpoN*$^{+}$(A) et *rpoN*$^{-}$(B).	159
Figure II. 6	Effet de la leucocine KM432Bz à 10 (■) et 5 µM (■) sur la formation d'un biofilm.	160
Figure II. 7	Effet de la leucocine KM432Bz à 10 (■) et 5 µM (■) sur un biofilm préfomé.	161
Figure II. 8	Gel d'agarose des produits PCR obtenu en utilisant des amorces spécifiques pour amplifier un fragment du gène codant le précurseur de la leucocine KM432Bz à partir de matrices correspondant aux ADN génomiques.	163

Tableau I. 1	Caractéristiques de quelques bactéries lactiques.	4
Tableau I. 2	Composants du MRS.	6
Tableau I. 3	Exemples d'applications des bactériocines comme conservateurs alimentaires d'après Gálvez, A. *et al.*	78
Tableau M. 1	Souches bactériennes utilisées.	88
Tableau M. 2	Caractéristiques des plasmides utilisés.	88
Tableau M. 3	Composition des milieux de culture utilisés.	90
Tableau M. 4	Caractéristiques des antibiotiques utilisés.	91
Tableau M. 5	Amorces oligonucléotidiques utilisées.	99
Tableau II. 1	Bactéries productrices de bactériocines isolées du boza.	117
Tableau II. 2	Bactériocines produites par des bactéries du genre *Leuconostoc.*	119

Résumé

Les bactéries lactiques préviennent la contamination de produits alimentaires par des bactéries pathogènes en inhibant leur prolifération, essentiellement par la production d'acide lactique et de peptides antimicrobiens nommés bactériocines. Les bactériocines sont synthétisées par voie ribosomique. Elles sont actives contre des bactéries phylogénétiquement proches incluant des pathogènes tels que *Listeria* et *Enterococcus*. Notre étude a porté sur l'isolement et la caractérisation d'une bactériocine produite par la souche KM432Bz isolée d'une boisson fermentée des Balkans, le boza et que nous avons identifiée comme un *Leuconostoc pseudomesenteroides*. Des analyses structurales par spectrométrie de masse et dégradation d'Edman de la bactériocine produite par *Ln. pseudomesenteroides* KM432Bz ont montré que sa structure primaire était similaire à celles de deux bactériocines de classe IIa, les leucocines A et B et à la leucocine A-QU15 récemment découverte. Le système génétique impliqué dans la biosynthèse de cette leucocine a été identifié et analysé. Le gène codant la préleucocine KM432Bz est identique à ceux codant les préleucocines B et A-QU15. La leucocine produite par la souche KM432Bz présente un spectre d'activité dirigé contre des espèces proches de la souche productrice telles que *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Weissella* ainsi que des espèces pathogènes appartenant aux genres *Listeria*, *Enterococcus* et *Streptococcus* avec des concentrations minimales inhibitrices comprises entre 0,08 et 10 µM. Par ailleurs, il a été montré que le facteur de transcription σ^{54}, impliqué dans la transcription de la mannose perméase du système phosphotransférase, est impliqué dans la sensibilité de *Listeria monocytogenes* à cette bactériocine.

Mots clés : peptide antimicrobien, bactériocine, leucocine, bactérie lactique, système génétique, E^{t}_{Man}.

Abstract

Lactic acid bacteria inhibit food spoilage bacteria by producing large amounts of lactic acid and growth-inhibiting peptides termed bacteriocins. Bacteriocins are ribosomally synthesized and are usually active against related species including pathogens, in particular *Listeria* and *Enterococcus*. We here isolated a bacteriocin produced by a strain called KM432Bz isolated from boza, a fermented drink usually consummed in Balkans, that we identified as a *Leuconostoc pseudomesenteroides*. Mass spectrometry and Edman degradation analyses performed on the bacteriocin we termed leucocin KM432Bz revealed that this antimicrobial peptide is similar to two class IIa bacteriocins, leucocins A and B and to leucocin A-QU15, discovered recently. The plasmid-located gene cluster involved in this leucocin biosynthesis was identified and analysed. Gene encoding preleucocin KM432Bz is identical to genes encoding preleucocins B and A-QU15. Leucocin KM432Bz purified from *Ln. pseudomesenteroides* inhibits the growth of related species such as *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Weissella* as well as pathogenic strains like *Listeria*, *Enterococcus* and *Streptococcus pneumoniae*. The minimal inhibitory concentrations determined for the purified bacteriocin are included in the 0.08-10 µM range. It has also been shown here that the transcription factor σ^{54}-dependent phosphotransferase system permease of the mannose family is involved in the sensitivity of *Listeria monocytogenes* to the potent bacteriocin.

Key words: antimicrobial peptide, bacteriocin, leucocin, lactic acid bacteria, gene cluster, E^{t}_{Man}.

Introduction générale

En raison de leur possible action carcinogène, tératogène et allergogène et d'une forte toxicité résiduelle sur les consommateurs, l'utilisation de conservateurs chimiques pour contrôler la prolifération de pathogènes dans les aliments doit être réduite. La bioconservation des aliments est une méthode biologique qui fait l'objet depuis 40 ans de nombreuses études. Elle consiste en une augmentation de la durée de vie et une amélioration de la sécurité sanitaire des produits alimentaires comme le fromage, grâce à l'utilisation de microorganismes et/ ou de leurs métabolites (Ross *et al.*, 2002, Stiles, 1996). En diminuant la perte économique due à la contamination de produits alimentaires, la bioconservation pourrait remplacer l'utilisation de conservateurs chimiques et les traitements thermiques. Elle permettrait une conservation naturelle des aliments en préservant leurs propriétés organoleptiques et nutritionnelles, souvent perdues sous l'effet des agents chimiques ou de la chaleur (Gálvez *et al.*, 2007, Settanni et Corsetti, 2008). C'est grâce aux propriétés antimicrobiennes des métabolites qu'ils synthétisent tels que l'éthanol, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle (Atrih et Foster, 2001a), les composés antifongiques (Corsetti *et al.*, 1998), les acides phényl-lactiques (Lavermicocca *et al.*, 2000), les antibiotiques comme la reutéricycline (Höltzel *et al.*, 2000) et les bactériocines, que les bactéries lactiques sont reconnues comme de bons agents de conservation des produits alimentaires (Abee *et al.*, 1995, Klaenhammer, 1988). Dans ce contexte, les bactéries lactiques et/ ou leurs métabolites utilisés depuis des millénaires d'une façon empirique par de nombreuses populations, peuvent contribuer à la conservation des aliments (Ross *et al.*, 2002). Aussi, l'industrie agroalimentaire en Europe s'intéresse à l'utilisation des bactériocines comme bioconservateurs (Robertson *et al.*, 2004).

Quelques bactériocines présentent des propriétés qui les placent parmi les substances sans danger pour l'Homme, comme en particulier l'absence de toxicité pour les cellules eucaryotes et la perte d'activité en présence des protéases présentes dans le tube digestif (Gálvez *et al.*, 2011). Par ailleurs, leur résistance aux variations de pH (pour quelques unes d'entre elles comme la lacticine 3147) et aux traitements thermiques, leur activité antimicrobienne bactéricide contre des bactéries pathogènes colonisant les produits alimentaires et l'absence de résistance croisée avec les antibiotiques en font de bons candidats pour la bioconservation des aliments (Gálvez *et al.*, 2007). Elles doivent cependant, pour le moment, être considérées comme un moyen de conservation complémentaire à ceux déjà

existants (Deegan *et al.*, 2006). Pour permettre leur bioconservation, les aliments sont supplémentés en bactéries productrices et/ ou directement en bactériocines.

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens synthétisés par voie ribosomique, naturellement produits par des bactéries à Gram négatif telles que les entérobactéries et plus souvent par des bactéries à Gram positif telle que les bactéries lactiques. Elles sont actives contre d'autes bactéries mais surtout contre des pathogènes majeurs tels que *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ou *Streptococcus pneumoniae*. Aussi, les bactériocines produites par les bactéries lactiques forment un groupe hétérogène de peptides antimicrobiens qui se distinguent par leur structure et leur mode d'action. De nombreuses recherches ont porté sur l'étude des bactériocines produites par les bactéries lactiques pour mieux comprendre leurs relations structure-fonction et favoriser ainsi leurs applications. Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont déjà largement utilisées par l'industrie agroalimentaire pour leurs propriétés de bioconservation (Gálvez *et al.*, 2011). Par ailleurs, l'émergence de la résistance des bactéries pathogènes à l'antibiothérapie a orienté l'industrie pharmaceutique vers la découverte de nouvelles molécules antimicrobiennes. Grâce à leur mode d'action différent des antibiotiques conventionnels, les bactériocine comme la mersacidine ou la lacticine 3147, pourraient être considérées comme une alternative au contrôle de la prolifération et à l'inhibition des souches bactériennes pathogènes devenues résistantes aux traitements usuels. De nombreuses bactériocines sont actuellement à l'étude pour être utilisées comme traitement médical (Dicks *et al.*, 2011)

L'objet de ma thèse a consisté en l'isolement et la caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique, *Leuconostoc pseudomesenteroides* (*Ln. pseudomesenteroides*) KM432Bz, présente dans une boisson fermentée bulgare appelée le boza.

Le **chapitre I** de cette thèse consistera en une étude bibliographique portant d'abord sur une présentation des bactéries lactiques et de la diversité des bactériocines et enfin par une présentation des applications actuelles et futures de ces molécules antimicrobiennes. Après la description des protocoles expérimentaux utilisés lors de cette étude (**Matériels et Méthodes**), les résultats seront présentés dans le **chapitre II** : « Caractérisation d'une bactériocine produite par une souche de *Ln. pseudomesenteroides* isolée du boza ». L'ensemble des résultats sera ensuite discuté pour aboutir à une conclusion générale et ouvrir sur les perspectives envisagées.

Les bactériocines produites par les bactéries à Gram positif Origine, diversité et rôle dans la bioconservation

I. Les bactéries lactiques

I.1. Généralités sur les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des bactéries à Gram positif qui regroupent 12 genres dont *Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus et Streptococcus*. Ces bactéries peuvent avoir des formes en bâtonnets ou en coques (**Figure I. 1a**, **Figure I. 1b**), sont immobiles et non sporulantes (**Tableau I. 1)**.

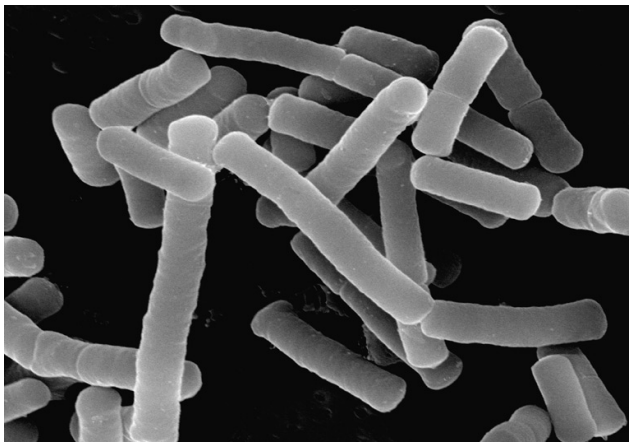


Figure I. 1a. *Lactobacillus* Rosell-11 observé au microscope électronique à transmission (M.E.T.) (x 10000). *(http://www.institut-rosell-lallemand.com/uploads/images/souches/lactobacillus-R52_big.jpg).*

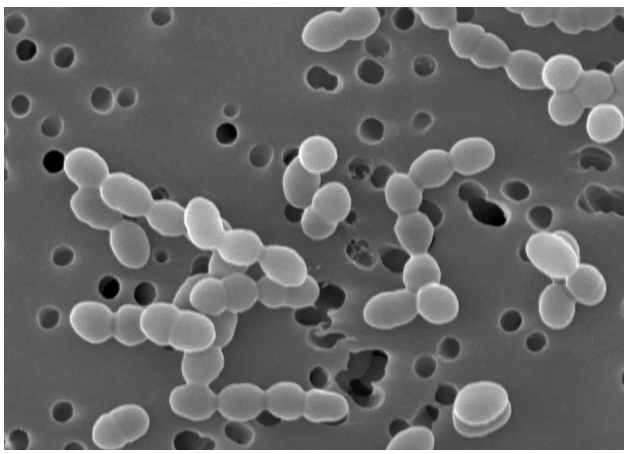


Figure I. 1b. *Leuconostoc lactis* observé au M.E.T. (x 10000).
(*http://www.oocities.com/cheezyfr/photos/Leuconostoc.jpg*).

Le **tableau I. 1** présente différentes caractéristiques des bactéries lactiques dont quelques propriétés cellulaire et biochimique ainsi que des informations génétiques.

Tableau I. 1. Caractéristiques de quelques bactéries lactiques.

Bactérie lactique	Propriétés cellulaires			Propriétés biochimiques		Informations génétiques		Référence
	Aspect	Habitat	T° optimale (°C)	CO_2	Configuration acide lactique	% GC	Taille génome (Mpb)	
***Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703**	bacille	intestin	37	-	D, L, (D+L)	59	2,1	(Suzuki *et al.*, 2006)
***Bifidobacterium longum* DJO10A**	bacille	intestin, tractus génital	37-41	-	D, L, (D+L)	60	2,3	(Lee *et al.*, 2008)
***Carnobacterium* sp. AT7**	bacille chaîne	viande, poisson	25-43	-	L	35	2,4	(Bartlett *et al.*, 2007)
***Enterococcus faecalis* AR01/DG**	coque isolé	intestin	37	-	L	37	2,8	(Feldgarden *et al.*, 2009)
***Lactobacillus casei* ATCC 334**	bacille chaîne	lait, tractus gastrointestinal et vaginal	25-42	+/-	D, L, (D+L)	46	2,9	(Makarova *et al.*, 2006)
***Lactobacillus fermentum* IFO 3956**	bacille	lait, tractus gastrointestinal et vaginal	25-41	+/-	D, L, (D+L)	51	2,1	(Morita *et al.*, 2008)
***Lactobacillus helveticus* DPCe 4571**	bacille	fromage	25-36	+/-	D, L, (D+L)	37	2,1	(Callanan *et al.*, 2008)
***Lactobacillus plantarum* WCFS1**	bacille isolé	plantes, tractus gastrointestinal	25-35	+/-	D, L, (D+L)	44	3,3	(Kleerebezem *et al.*, 2003)
***Lactobacillus reuteri* DSM 20016**	bacille chaîne	lait, tractus gastrointestinal et vaginal	25-37	+/-	D, L, (D+L)	38	2	(Copeland *et al.*, 2007)
***Lactobacillus rhamnosus* GG**	bacille	lait, tractus gastrointestinal et vaginal	25-38	+/-	D, L, (D+L)	46	3	(Kankainen *et al.*, 2009)
***Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 23K**	bacille	lait, tractus gastrointestinal et vaginal	25-39	+/-	D, L, (D+L)	41	1,9	(Chaillou *et al.*, 2005)
***Lactobacillus salivarius* UCC118**	bacille	lait, tractus gastrointestinal et vaginal	25-40	+/-	D, L, (D+L)	32	1,8	(Claesson *et al.*, 2006)
***Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11**	coque, chaîne, paire	lait, fromage, yaourt	40	-	L	35	2,4	(Makarova *et al.*, 2006)
***Leuconostoc citreum* KM20**	coque isolé	viande, plante	20-30	+	D	38	1,8	(Kim *et al.*, 2008)
***Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293**	coque isolé, chaîne, paire	viande, plante	40	+	D	37	2	(Makarova *et al.*, 2006)
***Oenococcus oeni* PSU-1**	coque isolé, chaîne	vin	17-25	+	D	37	1,8	(Makarova *et al.*, 2006)
***Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745**	tétrade*	viande, plante, fromage	30	-	D, L	37	1,8	(Makarova *et al.*, 2006)
***Streptococcus agalactiae* A909**	coque isolé	peau	37	-	L	35	2,1	(Tettelin *et al.*, 2005)
***Weissella paramesenteroides* ATCC 33313**	coque isolé	plante	30	+	D, (D+L)	37	1,9	(Qin *et al.*, 2009)

+ : Production de dioxyde de carbone (CO_2)/ - : Absence de production de CO_2.
D : L'isomère optique formé de l'acide lactique est de configuration D ; L : L'isomère optique formé de l'acide lactique est de configuration L ; D+L : L'acide lactique est sous forme racémique.
* : Une tétrade est formée lorsque quatre bactéries sont associées entre elles.

Les bactéries lactiques sont ubiquistes : elles sont retrouvées dans différentes niches écologiques comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses humaines et animales ainsi que dans le tractus digestif, ce qui explique leur température de croissance hétérogène (**Tableau I. 1**). Leur ADN présente un pourcentage de G + C compris entre 30 et 60% (Stiles et Holzapfel, 1997) et une taille de génome comprise entre 1,8 et 3,3 Mpb (**Tableau I. 1**).

Ces bactéries ont la capacité de fermenter les sucres (glucose, fructose, mannose, galactose, saccharose et lactose) en acide lactique (Kandler et Weiss, 1986). Elles ne produisent pas de pseudocatalase et possèdent un métabolisme anaérobie strict ou aérotolérant (Hardie, 1986) en raison de l'absence de chaîne respiratoire. Enfin, les bactéries lactiques utilisées dans l'alimentation sont considérées comme non pathogènes et se font attribuer le qualificatif anglo-saxon d'organismes GRAS (Generally Regarded As Safe) (Adams et Marteau, 1995, Aguirre et Collins, 1993). Cependant, parmi elles quelques espèces du genre *Streptococcus* et *Enterococcus* sont considérées comme des pathogènes opportunistes (Aguirre et Collins, 1993).

I.2. Habitat

Les bactéries lactiques sont présentes à l'état libre dans l'environnement ou vivent en association avec un hôte, tel que l'Homme ou l'animal, dans un écosystème bactérien comme le tractus gastro-intestinal ou génital des mammifères (Klein *et al.*, 1998).

I.2.1. Culture des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques demandent des milieux riches en différents nutriments pour croître (sucres, acides aminés, acides gras, sels, vitamines) et pauvres en oxygène (Hammes et Hertel, 2006). Elles sont essentiellement cultivées dans le milieu Man Rogosa Sharpe (MRS) (**Tableau I. 2**). Le MRS est un milieu riche qui offre aux bactéries à culture difficile différentes sources de carbone et d'azote, telles que les peptones, le glucose et le Tween 80,. Le Tween 80 était initialement utilisé comme émulsifiant dans la préparation des milieux de culture avant d'être considéré comme source de carbone pour les bactéries.

Tableau I. 2. Composants du MRS.

MRS pH 6,2 +/-2	
Composition	Quantité (g/ l)
Peptone	10
Extrait de viande de boeuf	8
Extrait de levure	4
Glucose	20
Citrate d'ammonium	2
Acétate de sodium 3 H_2O	5
Sulfate de magnésium 7 H_2O	0,2
Sulfate de manganèse 4 H_2O	0,05
Hydrogénophosphate de potassium	2
Tween 80	1 ml

(http://www.oxoid.com/fr/index.asp?mpage=iproductdetail&pre=CM0361&l=FR&x)

I.2.2. Présence des bactéries à l'état libre dans l'environnement

Dans l'environnement, les bactéries lactiques sont souvent retrouvées dans le lait et ses dérivés (lait fermenté, fromages, …). Les différentes espèces de *Lactobacillus, Lactococcus lactis* (*Lc. lactis*) et/ ou *Lc. garvieae*, les plus rencontrées dans le lait et le fromage, sont communément utilisées comme ferments (« starter culture ») par l'industrie agroalimentaire pour la production de produits laitiers. Un ferment désigne un micro-organisme, bactérie ou champignon, responsable de la fermentation. Aussi, les bactéries lactiques sont à l'origine de la fermentation utilisée pour la préparation de boissons à partir de plantes (boza, cidre, …). Parmi elles, on distingue des espèces appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Leuconostoc* (Gálvez *et al.*, 2011).

Acidotolérantes, les bactéries lactiques sont capables de survivre dans des milieux très acides en raison de leur production d'acide lactique. De plus, l'acidification du milieu participe à l'inhibition de la croissance de certains microorganismes pathogènes, tels que *Listeria monocytogenes (Li. monocytogenes).* Cette espèce bactérienne pathogène présente dans les aliments (lait, fromage, boissons) est responsable d'infections graves comme la listériose chez l'Homme, qui affectent en particulier la femme enceinte (Gálvez *et al.*, 2011).

I.2.3. Présence des bactéries lactiques en association avec un hôte

Les bactéries lactiques peuvent vivre en symbiose entre elles et avec un hôte. La symbiose est une association intime et durable entre deux organismes hétérospécifiques (espèces différentes), parfois plus.

Le tractus gastrointestinal des mammifères est colonisé par des bactéries lactiques telles que *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, et *Weisseilla*. Par ailleurs, l'appareil génital chez la femme est principalement colonisé par des bactéries lactiques, telles que *Lactobacillus*, auxquelles il apporte des nutriments comme le glycogène. En acidifiant le milieu, ces bactéries apportent une protection contre des pathogènes responsables d'infections vaginales comme *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*), pathogène responsable de la trichomonase vaginale (Björkroth et Holzapfel, 2006, Ruiz *et al.*, 2009) et/ ou *Candida albicans* à l'origine de la vulvo-vaginite (Falagas *et al.*, 2006, Pirotta *et al.*, 2004).

I.3. Les fermentations

I.3.1. Définition des fermentations

La fermentation est un processus produisant de l'énergie par oxydation de composés organiques, principalement des glucides, où un donneur d'électron, NADH cède ses électrons à un accepteur endogène, le pyruvate (**Figure I. 2**). Dans la respiration les électrons sont donnés à un accepteur exogène, l'oxygène pour la respiration aérobie et le nitrate ou le sulfate pour la respiration anaérobie. La fermentation ne nécessitant pas l'absence totale d'oxygène, certaines levures comme *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) et certaines bactéries comme *Lactobacillus plantarum* (*Lb. plantarum*) utilisent la fermentation en présence d'oxygène pour dégrader les sucres (Prescott *et al.*, 2003, Weiss *et al.*, 1968).

Les sucres tels que le glucose, le fructose, le lactose ou le saccharose sont les substrats les plus utilisés pour la fermentation, engendrant la production d'énergie et de métabolites comme l'acide lactique et l'éthanol avec un dégagement de gaz (CO_2) dans certains cas. Cependant d'autres métabolites, moins communs comme l'acide butyrique et l'acétone sont produits au cours de la fermentation.

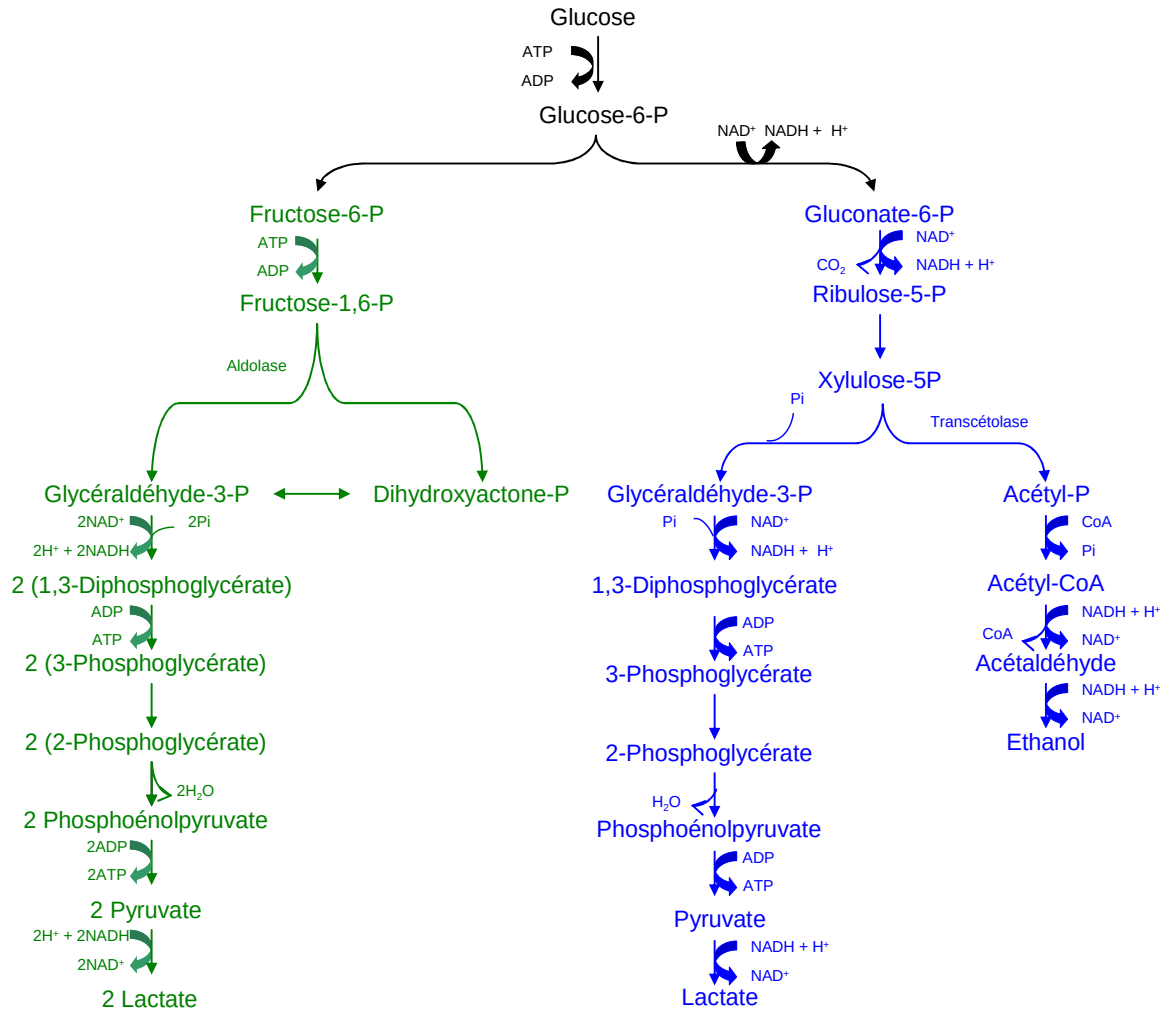


Figure I. 2. Représentation schématique des principales voies de fermentation des hexoses chez les bactéries lactiques.

ATP : adénosine triphosphate.
ADP : adénosine diphosphate.
NAD^+/ NADH, H^+ : Couple oxydant/réducteur du nicotinamide adénine dinucléotide.
P_i : phosphate inorganique.

Il existe plusieurs voies de fermentations, dont la fermentation alcoolique, la fermentation lactique, la fermentation butyrique et la fermentation propionique. Les fermentations alcoolique et lactique sont les plus connues et les plus couramment utilisées par les microorganismes. La fermentation alcoolique, principalement réalisée par les levures telle que *S. cerevisiae*, produit de l'éthanol et du CO_2. Elle est souvent utilisée pour la production de bières et de vins.

La réaction bilan de la fermentation alcoolique est :

$C_6H_{12}O_6 + 2\ ADP + 2\ P_i \longrightarrow 2\ \mathbf{C_2H_5OH} + 2\ CO_2 + 2\ ATP$

Glucose **Ethanol**

La fermentation lactique est réalisée par les bactéries lactiques pour produire principalement de l'acide lactique et d'autres métabolites tels que l'éthanol et le CO_2 (**Figure 2a, 2b**).

La réaction bilan de la fermentation lactique est :

$C_6H_{12}O_6 + 2\ ADP + 2\ P_i \longrightarrow 2\ \mathbf{C_3H_6O_3} + 2\ ATP$

Glucose **Acide lactique**

Suivant les microorganismes, l'isomère optique formé est soit l'acide lactique D, soit l'acide lactique L, soit la forme racémique (D + L) (**Tableau 1**). Par ailleurs, la proportion d'acide lactique formé augmente en fonction de l'acidité du milieu (87% à pH 5, 61% à pH 9).

I.3.2. Les fermentations lactiques

Les bactéries lactiques utilisent la fermentation lactique pour dégrader les glucides et synthétiser de l'énergie sous forme d'ATP. Il existe deux voies principales de fermentation lactique. L'homofermentation regroupe la voie de la glycolyse, aussi connue sous le nom de voie d'Embden-Meyerhof (Parnas) (**Figure I. 2a**), suivie de la conversion de 2 molécules de pyruvate en 2 molécules de lactate. Elle est surtout utilisée par les bactéries appartenant au genre *Streptococcus* et à certaines espèces de *Lactobacillus* comme *Lactobacillus bulgaricus* (*Lb. bulgaricus*), *Lactobacillus casei* (*Lb. casei*), *Lactobacillus caucasicus*, *Lactobacillus lactis* (*Lb. lactis*) et *Lb. plantarum* et de *Thermobacterium* comme *Thermobacterium yoghurti*. Au cours de cette voie de fermentation, ces bactéries dégradent le glucose, le fructose, le mannose, le galactose, le saccharose ou le lactose.

L'hétérofermentation (**Figure I. 2b**), communément appelée voie des pentoses phosphate (transcétolases) (Kandler, 1983) se produit chez des espèces appartenant à *Lactobacillus*, telles que *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermenti* et à *Leuconostoc*, telles que *Leuconostoc mesenteroides* (*Ln. mesenteroides*) et *Leuconostoc pentosaceus*. Au cours de l'hétérofermentation, les bactéries dégradent les hexoses avec formation quasi stœchiométrique d'une molécule d'acide lactique, d'une molécule de CO_2 et d'une molécule

d'éthanol (Kandler, 1983). Les sucres à cinq atomes de carbone ou pentoses, comme le fructose, peuvent parfois être fermentés et donnent alors une molécule d'éthanol et une molécule d'acide lactique. Outre ces produits, qui représentent plus de 80% des métabolites obtenus, on obtient également de l'acide acétique et du glycérol. Cependant, il existe d'autres types de fermentations telles que la fermentation malolactique, moins connue, qui est principalement utilisée par *Oenococcus oeni* (*O. oeni*) pour la désacidification du vin. La fermentation malolactique commence après la fermentation alcoolique et consiste en la conversion de l'acide malique en acide lactique avec dégagement de CO_2 (Zaunmüller *et al.*, 2006).

Les bactéries lactiques forment un groupe hétérogène en raison non seulement de leur métabolisme mais aussi de leur aspect, leur habitat,… Cette hétérogénéité confère aux bactéries lactiques une diversité qui a permis de leur dresser une taxonomie.

I.4. Diversité et taxonomie

I.4.1. Origine des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques ont été retrouvées dans des sédiments datant de 2,75 milliards d'années bien avant l'apparition d'oxygène dans l'atmosphère, ce qui pourrait expliquer leur caractère anaérobie (Quiberoni *et al.*, 2001). De plus, des études sur la phylogénie bactérienne mentionnent leur apparition avant celle des cyanobactéries (Quiberoni *et al.*, 2001). D'autres études montrent que certaines bactéries lactiques, comme *Lb. lactis*, sont en voie d'acquérir une chaîne respiratoire (Duwat *et al.*, 2001).

I.4.2. Diversité des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques regroupent de nombreux genres bactériens tels que *Bifidobacterium, Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus, Weissella,…* (**Tableau I. 1, Figure I. 3.**).

De plus, l'utilisation des séquences de gènes codant les ARN 16S et 23S a conduit à l'identification de nouveaux genres bactériens parmi des bactéries lactiques, tels que *Carnobacteria, Enterococcus, Tetragenococcus* et *Vagococcus* issue d'une evolution taxonomique (Vandamme *et al.*, 1996).

Parmi les bactéries lactiques, *Lactobacillus* présente le genre le plus répandu. Ce dernier comprend à lui seul de nombreuses espèces qui diffèrent par leurs caractéristiques phénotypiques, biochimiques et génétiques (Vandamme *et al.*, 1996).

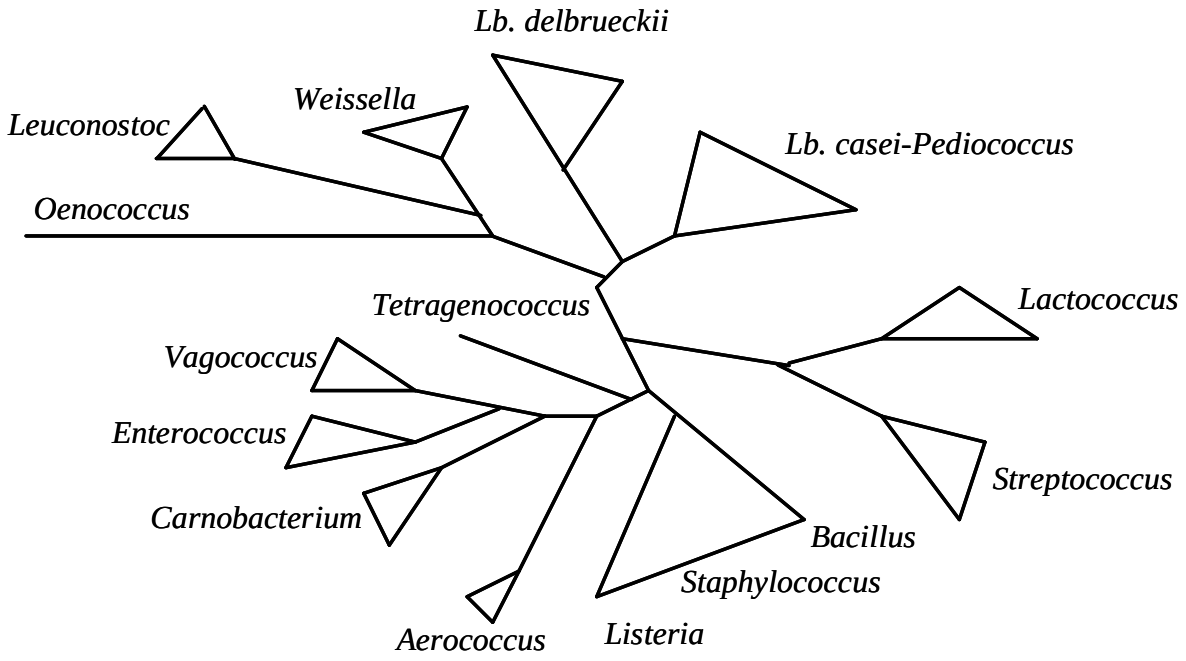


Figure I. 3. Arbre phylogénique des bactéries lactiques et comparaison avec les genres *Aerococcus, Bacillus, Listeria* et *Staphylococcus* d'après Axelsson, 2004.

I.4.3. Taxonomie des bactéries lactiques

La classification des levures, des bactéries, des virus et des protistes est basée sur la taxonomie polyphasique. Ce terme est apparu dans les années 70 défini par Colwell (Colwell, 1970) et se réfère à une taxonomie basée sur un large ensemble de critères regroupant les caractéristiques écologiques, phénotypiques, biochimiques et génétiques (Pot, 2008). De nombreuses classifications des bactéries lactiques ont été proposées. Parmi elles, figure la classification selon la composition de la paroi cellulaire bactérienne (de Ambrosini *et al.*, 1996), incluant la nature des acides gras, tels que l'acide lactobacillique ($C_{19:0}$) et les acides gras insaturés ($C_{14:0}$, $C_{16:0}$, $C_{18:0}$) qui la composent (Gilarová *et al.*, 1994). Une autre classification, basée sur les différents modèles de fermentation du glucose définit 3 groupes (McLeod *et al.*, 2008). Le groupe I renferme les bactéries réalisant exclusivement l'homofermentation. Ce groupe comporte majoritairement des *Lactobacillus*. Le groupe II inclut les bactéries réalisant l'hétérofermentation et regroupe les *Leuconostoc*, les *Oenococcus*, les *Weissella* et quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus.* Le groupe

III regroupe quant à lui quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus* et la majorité des espèces appartenant au genre *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*. Ce groupe présente une position intermédiaire entre le groupe I et II réalisant ainsi l'homofermentation ou l'hétérofermentation selon les conditions environnementales (McLeod *et al.*, 2008).

Les études d'hybridation ADN ÷ ADN, puis des structures et des séquences d'ARN ribosomaux sont aussi devenues depuis quelques années des éléments essentiels permettant l'identification et ainsi la classification taxonomique des bactéries lactiques (Mäkelä *et al.*, 1992, Stanckebrandt et Teuber, 1988, Vandamme *et al.*, 1996, Woese *et al.*, 1990). Une étude basée sur la comparaison des séquences d'ARN 16S et/ ou 23S des bactéries lactiques propose une classification en 3 groupes restreinte à certaines bactéries lactiques : groupe des *Leuconostoc*, groupe des *Lactobacillus delbrueckii* (*Lb. delbrueckii*) et groupe des *Lb. casei-Pediococcus* (Rodrigues *et al.*, 1991).

I.5. Utilisation des bactéries lactiques

I.5.1. Utilisation des bactéries lactiques productrices de bactériocine(s)

C'est durant le XIX^{e} siècle, au Danemark, que la première boisson fermentée fabriquée à partir d'un mélange de souches bactériennes isolées à partir de lait cru a été commercialisée. Le concept de ferment a ensuite évolué au début du XX^{e} siècle après l'identification de quelques souches impliquées dans la fermentation.

Grâce à leur propriétés d'acidification et de production de polysaccharides, les bactéries lactiques ont souvent été utilisées en co-cultures pour initier et/ ou améliorer la fermentation de nombreux aliments comme la choucroute, les saucisses ou les olives vertes (Settanni et Corsetti, 2008). Cependant, une des caractéristiques des bactéries lactiques qui leur permet de se placer comme bio-conservateur est leur production de molécules antimicrobiennes (Settanni et Corsetti, 2008). La production de bactériocine *in situ* offre de nombreux avantages comparée à la production de bactériocine *ex situ*, comme le coût ou l'augmentation de la compétition avec la microflore résidente augmentant ainsi l'inhibition de croissance des bactéries pathogènes. La diminution du coût de préparation pourrait généraliser la pratique permettant aux pays en voie de développement où la sécurité alimentaire est le plus souvent compromise de bénéficier de ces applications (Holzapfel, 2002). D'autres qualités ont depuis été associées aux bactéries lactiques lorsqu'elles sont associées aux produits alimentaires comme l'augmentation des valeurs nutritionnels des aliments, la réduction de la formation de

produits toxiques et la propriété de probiotique. En plus de la propriété de bioconservation, plusieurs propriétés ont été attribuées aux bactéries productrices de bactériocines telles que la diminution des gaz dus à la fermentation ainsi qu'à l'amélioration du goût et de la qualité du produit fini.

Grâce à leur activité protéolytique et leur acidification importante du milieu, les bactéries productrices de bactériocines sont utilisées soit pour initier la fermentation soit pour jouer le rôle d'adjuvant en présence d'une bactérie initiatrice de fermentation (Gálvez *et al.*, 2011). Aussi, la croissance de la co-culture ne doit avoir aucun effet sur les propriétés physicochimiques et organoleptiques du produit fini, ni interférer avec celles-ci. De plus, la bactérie productrice doit être prédominante et capable de produire sa bactériocine à n'importe quelle température, pendant la réfrigération ou à température ambiante, afin d'empêcher la croissance et la prolifération des bactéries pathogènes dans les aliments (Holzapfel *et al.*, 1995).

Les bactéries productrices sont aussi utilisées comme cultures bio-protectrices dans les aliments non fermentés dans la mesure où elles ne présentent aucun effet négatif sur le produit fini. De nombreuses souches bactériennes productrices de bactériocines sont actuellement utilisées dans les produits alimentaires fermentés, tels que les produits laitiers, les viandes, les poissons ou les légumes. Les souches bactériennes du genre *Lactococcus* sont les bactéries productrices de bactériocines les plus utilisées. La souche bactérienne productrice de la nisine, *Lc. lactis*, est souvent utilisée lors de la fermentation de fromages comme le Manchego ou le Camembert en raison de ses propriétés antibactériennes dirigées contre *Li. monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* (*Sta. aureus*) (Gálvez *et al.*, 2008). Les souches productrices de nisine Z sont aussi utilisées pour limiter les gaz produits lors de la fermentation, qui sont le plus souvent dus à une surcroissance de spores de *Clostridium* et en particulier de *Cl. tyrobutyricum*. La souche productrice de lacticine 3147 est aussi utilisée pour le contrôle de la prolifération de *Li. monocytogenes* dans les aliments tels que les fromages fabriqués à partir du lait écrémé (O'Sullivan *et al.*, 2006). L'optimisation de l'arôme du fromage pourrait être réalisée par l'utilisation des souches productrice de lacticine 3147 en combinaison avec des cultures bactériennes productrices d'aminotransférases et de décarboxylases (Fernández de Palencia *et al.*, 2004).

Du fait de leur robustesse, leur présence naturelle dans différents produits alimentaires et leur production de nombreuses bactériocines, *Enterococcus faecalis* (*En. faecalis*) et *En.*

faecium productrices de bactériocines sont largement utilisées comme adjuvants (Franz *et al.*, 2007). Les bactéries appartenant au genre *Pediococcus* productrices de bactériocines ne sont pas adaptées à la fabrication des produits laitiers fermentés de par leur manque ou leur lenteur de fermentation du lactose (Papagianni et Anastasiadou, 2009). En revanche, la souche *Pediococcus acidilactici* productrice de pédiocine PA-1/ AcH s'est révélée être responsable de la bonne conservation de la viande en diminuant les populations de *Li. monocytogenes* et de *Clostridium perfringens* (Rodríguez *et al.*, 2002).

Les bactéries lactiques sont, de loin, la catégorie de microorganismes la plus utilisée dans la production de produits alimentaires contribuant ainsi à la texture et au goût des produits fermentés. Par ailleurs, la production par ces bactéries de métabolites tels que les peptides antimicrobiens et l'acide lactique, permet d'inhiber la prolifération des microorganismes pathogènes et d'assurer ainsi une bonne conservation des aliments (Pot, 2008).

I.5.2. Notion de probiotique

a. Définition d'un probiotique

Les probiotiques sont des microorganismes vivants, qui lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent un effet bénéfique sur la santé de l'hôte (FAO, 2001). Consommés depuis des centaines d'années, les produits laitiers ont toujours été considérés comme source de santé et de longévité, dans le Caucase et au Moyen-Orient. Ce n'est qu'à partir du XX^{e} siècle, qu'Elie Metchnikoff évoqua une éventuelle relation entre la longévité de certaines populations et leur consommation de grandes quantités de lait fermenté. Plus tard, il isola deux espèces bactériennes *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (*Str. salivarius* subsp. *thermophilus*) et *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* auxquelles il attribua les bienfaits de « longue vie ». Ce n'est qu'en 1954, que le terme « probiotique » a été pour la première fois introduit dans la littérature par Ferdinand Vergin (Vergin, 1954). Pour optimiser leur croissance, les probiotiques nécessitent la présence de fibres composées d'oligosaccharides comme l'inuline extraite de la racine de chicorée, appelées prébiotiques.

De nombreux microorganismes sont considérés comme probiotiques, parmi eux des bactéries lactiques telles que *Bifidobacterium animalis, Bifidobacterium breve, Bifidobacterium longum, Lb. acidophilus, Lb. bulgaricus, Lb. casei,* et *Streptococcus thermophilus* (*Str. thermophilus*). *Lb. bulgaricus* et *Str. Thermophilus* sont les premières souches bactériennes qui ont été utilisées pour la fabrication de yaourt. Ainsi, la dénomination

yaourt ou yoghourt se réfère à un lait fermenté obtenu, selon des usages loyaux et constants, par le développement des seules bactéries lactiques thermophiles spécifiques dites *Str. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* qui doivent être ensemencées et se trouver vivantes dans le produit fini à raison d'au moins 10^7 bactéries par gramme. D'autre part, des levures comme *S. boulardii* et *S. cerevisiae,* communément utilisées dans la fabrication du pain, de la bière et du kéfir, sont également reconnues pour leurs propriétés probiotiques. *S. boulardii* a été isolée pour la première fois à partir de fruits de litchis et de mangoustans par le scientifique Français Henri Boulard en 1923. Il a été démontré, plus tard, que *S. boulardii* permet la restauration de la flore du gros intestin après des diarrhées causées par *Vibrio cholerae* (Dias *et al.*, 1995).

b. Rôle du probiotique

Pour être considéré comme probiotique, un micro-organisme ne doit présenter ni toxicité ni pathogénie. Les probiotiques doivent être capables de moduler la réponse immunitaire (Schiffrin *et al.*, 1997) et/ ou produire des substances antimicrobiennes. Ils doivent être aussi capables de survivre et de proliférer dans les milieux naturels occupés par des bactéries pathogènes.

Plusieurs études ont attribué de nombreuses propriétés aux probiotiques dans lesquels ils participent à l'activation de l'immunité et à la réduction d'allergies chez les sujets à risque (Gourbeyre *et al.*, 2011, Kalliomaki *et al.*, 2001, Savilahti *et al.*, 2008). La résistance à l'acide gastrique et à la bile, permet aux probiotiques de survivre dans le tube digestif où réside une partie de l'immunité (Grangette *et al.*, 2002, Klaenhammer et Kullen, 1999). Les lymphocytes sont présents à l'état isolé au niveau de l'épithélium et dans la *lamina propria*, mais ils sont aussi regroupés dans la sous-muqueuse dans des structures spécialisées appelées les plaques de Peyer. A chaque site de l'intestin, de l'épithélium, de la *lamina propria* et de la plaque de Peyer, les types et fonctions des lymphocytes diffèrent. Dans l'épithélium, il s'agit majoritairement de lymphocytes T CD8 et dans la *lamina propria* et à l'état isolé, il s'agit de populations mélangées comprenant des lymphocytes T CD4 et des lymphocytes B. Les plaques de Peyer contiennent un cœur de lymphocytes B et un petit nombre de lymphocytes T CD4. Aussi, les probiotiques participent au développement du système immunitaire chez le nourrisson et l'améliorent chez la personne âgée en augmentant le nombre de phagocytes et de lymphocytes natural killer, premières défense contre un agent exogène (Donnet-Hughes *et al.*, 1999, Haller *et al.*, 2002). Ils agissent également sur l'immunité en colonisant le tractus intestinal, réalisant ainsi « un effet barrière » (Logan et Katzman, 2005, Penner et Fedorak,

2005b). L'« effet barrière », empêche d'une part la colonisation de l'épithélium par des pathogènes et renforce d'autre part l'immunité au niveau des muqueuses intestinales en augmentant la production d'IgA et de mucus, défenses locales au niveau des muqueuses (Kaila *et al.*, 1992).

c. Applications des probiotiques

Grâce à leurs propriétés nutritionnelles et thérapeutiques utilisées par les industries agroalimentaires et pharmaceutiques, les probiotiques sont parfois utilisés comme compléments dans des produits comme les yaourts ou bien dans des préparations pharmaceutiques sous forme de gélules. De nombreuses souches bactériennes ont montré leurs bénéfices sur la santé humaine et sont déjà commercialisées par Danone telles que *Bifidobacterium lactis* (bifidus actif) utilisée dans la production des yaourts Activia® (**Figure I. 4a**) (Picard *et al.*, 2005) ou *Lb. casei* retrouvé dans Actimel® (**Figure I. 4b**).



a. Activia® Danone.
www.activia.co.id/img3/bottles.jpg



b. Actimel® Danone.
media.telemarket.fr/.../00055875/00055875-t0.jpg

Figure I. 4. Produits laitiers commercialisés fabriqués à partir de bactéries considérées comme probiotiques.

En Europe, toute nouvelle souche introduite dans l'alimentation doit faire l'objet d'une évaluation selon le système QPS (Qualified Presumption of Safety, présomption de sécurité qualifiée) depuis novembre 2007. Le système européen QPS, est un outil d'évaluation de la sécurité des cultures de microorganismes utilisé par l'EFSA (European Food Safety Authority) pour lesquelles une demande d'autorisation de mise sur le marché est nécessaire. Ce système s'appuie sur 4 piliers: l'identité précise de la souche (criblage), l'état des connaissances, le type d'application (matrice) et le rapport innocuité/ pathogénie (EFFCA, 2011).

Les probiotiques ne sont pas seulement utilisés comme additifs alimentaires mais aussi en association avec des traitements médicaux conventionnels dans quelques préparations pharmaceutiques du fait de leur reconnaissance en tant que GRAS aux Etats-Unis (Saarela *et al.*, 2000, Salminen *et al.*, 1998). L'agence Américaine du Médicament (Food and Drug Agency, FDA), estime que les produits contenant des probiotiques ne font pas objet des mêmes recommandations que les médicaments. En revanche, l'Agence Européenne des Médicaments (European Medicines Evaluation Agency, EMEA) n'a toujours pas autorisé cette utilisation.

- Traitement des diarrhées

Les souches probiotiques *Lb. acidophilus* et *Lb. casei*, qu'on retrouve entre autres dans le lait fermenté Bio-K+®, ont fait l'objet d'études montrant leur efficacité contre la diarrhée associée à la prise d'antibiotiques en milieu hospitalier (Kelleher *et al.*, 2002, Penner *et al.*, 2005a). Des études ont montré l'action préventive des probiotiques lors de diarrhées infectieuses causées par un traitement antibiotique, par radiothérapie et après des rechutes de colite ulcéreuse (Plummer *et al.*, 2004, Reid *et al.*, 2003b). La colite ulcéreuse est une maladie inflammatoire chronique du côlon et du rectum de nature auto-immune qui s'apparente à la maladie de Crohn.

- Traitements gastriques

Des travaux prometteurs sur l'amélioration des traitements gastriques sont en cours sur la conjonction des probiotiques aux antibiotiques en vue de limiter les infections à *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), une bactérie impliquée dans la survenue et les récidives des gastrites et ulcères gastro-duodénaux. Les études sur ce traitement se poursuivent car son efficacité reste à démontrer (Reid *et al.*, 2003b).

Les probiotiques réduisent la récurrence des infections causées par des pathogènes au niveau des muqueuses. Des traitements probiotiques contre des vaginites causées par *T. vaginalis* présentant des résultats prometteurs sont toujours en cours d'études cliniques (Jeavons, 2003, Pirotta *et al.*, 2004, Reid et Bruce, 2003a, Sobel, 1999).

Les applications des probiotiques se sont énormément étendues ces dernières années, tant dans le domaine agroalimentaire que médical. Cette partie sera développée plus loin dans le paragraphe *V. Les applications des bactériocines*.

II. Les peptides antimicrobiens produits par les bactéries à Gram positif

II.1. Définitions, généralités

Il existe plusieurs définitions du terme bactériocine. A l'origine, ce terme a été utilisé pour désigner les protéines et peptides antimicrobiens synthétisés selon la voie ribosomique. Plus précisément, les bactériocines sont considérées comme des substances protéiques présentant une activité antimicrobienne (**Figure I. 3**). Ainsi les bactériocines, peuvent être isolées chez de nombreuses bactéries et archées (Klaenhammer, 1988).
Dans cette thèse, nous parlerons des bactériocines produites par les bactéries à Gram positif (Jack *et al.*, 1995, Tagg *et al.*, 1976) et plus particulièrement celles provenant des bactéries lactiques (Cotter *et al.*, 2005b).

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens le plus souvent cationiques, modifiés ou non post-traductionnellement, de masses moléculaires comprises entre 2 et 6 kDa (Heng *et al.*, 2007a). Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont généralement actives à faible concentration contre des bactéries phylogénétiquement proches (Belguesmia *et al.*, 2011, Cotter *et al.*, 2005b). Cependant, plusieurs genres de bactéries à Gram négatif tels que *Haemophilus, Helicobacter* ou *Neisseria* se sont révélés être sensibles à certaines de ces bactériocines (Morency *et al.*, 2001). L'activité antimicrobienne des bactériocines a un effet soit bactéricide, provoquant la mort de la bactérie cible, soit bactériostatique inhibant la croissance bactérienne. Les bactériocines les plus étudiées sont celles produites par les bactéries lactiques connues pour leur rôle dans la bonne conservation des aliments (Cotter *et al.*, 2005b).

La biosynthèse des bactériocines implique le plus souvent des groupes de gènes ou clusters comportant une ou plusieurs unités de transcription. Il existe une appellation génotypique spécifique pour chaque bactériocine, par exemple *nis* pour le cluster de gènes impliqué dans la biosynthèse de la nisine et *mrs* pour celui impliqué dans la biosynthèse de la mersacidine. Les clusters de gènes impliqués dans la biosynthèse des bactériocines sont formés de trois groupes de gènes. Un groupe renfermant un gène de structure codant le peptide précurseur et un gène d'immunité codant une protéine d'immunité impliquée dans la protection de la souche productrice contre sa propre bactériocine. Le deuxième groupe de gènes rassemble un gène codant un transporteur ABC impliqué dans le transport de la bactériocine vers le milieu extracellulaire ainsi que chez quelques bactériocines, un gène

codant une protéine accessoire impliquée dans le transport de la bactériocine, et enfin un gène codant une protéine de fonction inconnue. Le dernier groupe de gènes est impliqué dans la régulation de la biosynthèse des bactériocines et regroupe un gène codant une protéine kinase membranaire et un gène codant un activateur transcriptionnel. Le transport du peptide précurseur sollicite un transporteur ABC chez de nombreuses bactéries productrices. D'autres souches productrices utilisent le système Sec pour l'export de leur peptide précurseur (Drider *et al.*, 2006, Maqueda *et al.*, 2008). Une fois synthétisé, le peptide précurseur subit un clivage par une protéase spécifique chez quelques bactériocines, afin d'acquérir sa forme mature qui est exportée vers le milieu extracellulaire via le transporteur ABC. La biosynthèse des bactériocines n'est pas constitutive et se trouve régulée soit par la bactériocine elle-même qui joue le rôle de phéromone soit par une phéromone spécifique (Diţu *et al.*, 2009).

Une fois dans le milieu extracellulaire, la bactériocine interagit avec la membrane plasmique de la bactérie cible via des interactions électrostatiques. L'effet antimicrobien se traduit généralement par la formation de pores dans la membrane de la bactérie cible. Différents mécanismes d'action sont connus, le plus courant consiste en une perméabilisation de la membrane de la bactérie cible. Ce phénomène se traduit par la formation de pores transitoires ou permanents provoquant la dissipation d'ATP, d'ions K^+, Na^+,… et la mort de la bactérie cible (Nissen-Meyer *et al.*, 2009, Nissen-Meyer *et al.*, 2010). La bactériocine peut également interagir soit directement avec la membrane plasmique ou bien via un récepteur membranaire comme c'est le cas de la nisine avec le lipide II (voir paragraphe III : *Les bactériocines de classe I : les lantibiotiques*) et les bactériocines « pediocin-like » avec le système mannose perméase phosphotransférase impliqué dans le transport des sucres (voir paragraphe *IV : Les bactériocines de classe II*) (Héchard et Sahl, 2002). D'autres effets antimicrobiens moins fréquents sont également rencontrés comme l'inhibition de la synthèse d'acides nucléique et de la synthèse de la paroi bactérienne, comme c'est le cas de la mersacidine (Brogden, 2005). Cette partie sera développée dans le paragraphe III : *Les bactériocines de classe I : les lantibiotiques*.

II.2. Classification

Les bactériocines diffèrent entre elles par leur structure primaire, leur structure tridimensionnelle, leur mode d'export et leur mécanisme d'action. Cette forte divergence a rendu leur classification assez difficile et plusieurs classifications ont été successivement proposées. Se basant sur la structure primaire, le mode d'action et la structure

tridimensionnelle, Klaenhammer et al. (Klaenhammer, 1993) ont proposé deux classes principales de bactériocines, la classe I regroupant les bactériocines modifiées post-traductionnellement, les lantibiotiques et la classe II renfermant les bactériocines non modifiées et thermo-résistantes appelées « pediocin-like ». Ces deux classes ont été par la suite subdivisées en sous-classes. Se rajoute à ces deux classes une troisième classe (la classe III) qui renferme les bactériolysines, des protéines thermosensibles pourvues d'activité enzymatique (Klaenhammer, 1988) ainsi qu'une dernière classe (la classe IV) regroupant des complexes protéiques liés à une partie lipidique ou glucidique (Heng *et al.*, 2007a). Cette dernière classe n'étant pas clairement caractérisée, de nombreux auteurs ont préféré l'écarter de la classification. Considérant la classe IV comme inappropriée, Diep et Nes (Diep et Nes, 2002) ont proposé une classification des bactériocines en accord avec celle de Klaenhammer, mais sans la classe IV. Ensuite, différents auteurs ont proposé une nouvelle classe IV, composée des bactériocines circulaires et dans le même temps, soit l'abandon de la classe III (Nes *et al.*, 2007), soit son maintien dans la classification (Heng *et al.*, 2007a).

Parallèlement, Cotter et al. (Cotter *et al.*, 2005b) ont proposé une classification regroupant les bactériocines en deux groupes principaux. La classe I, ou lantibiotiques, est subdivisée en plusieurs groupes en fonction de leur structure primaire tandis que la classe II est subdivisée en quatre sous-groupes : les classes IIa des « pediocin-like », IIb des « two-peptides », IIc des bactériocines circulaires et IId des bactériocines non modifiées et non « pediocin-like ». Pourvues d'activité enzymatique, les bactériocines de classes III sont plutôt considérées comme des enzymes que comme des peptides antimicrobiens et sont par conséquent écartées de la classification (Cotter *et al.*, 2005b). En fait, seules les classes I et II sont communément admises par la plupart des auteurs. Cependant on peut remarquer que les bactériocines circulaires peuvent constituer soit la classe IV (Heng *et al.*, 2007a, Nes *et al.*, 2007), soit la classe IIc (Cotter *et al.*, 2005b, Nissen-Meyer *et al.*, 2009), selon les auteurs. Récemment, une nouvelle classification a été proposée par Zouhir et al. (Zouhir *et al.*, 2010). Elle est basée uniquement sur la structure primaire et propose 12 groupes distincts de bactériocines.

Dans notre étude, nous nous baserons sur le modèle de classification de Paul Cotter (Cotter *et al.*, 2005b), qui propose deux classes principales de bactériocines : **la classe I** appelée la classe des lantibiotiques regroupant les bactériocines modifiées post-

traductionnellement et **la classe II** qui regroupe les bactériocines non modifiées. Les sous-divisions de chaque classe de bactériocines seront développées plus loin.

III. Les bactériocines de classes I : les lantibiotiques

Les lantibiotiques sont des peptides antimicrobiens synthétisés par voie ribosomique et subissant des modifications post-traductionnelles importantes. Ils se distinguent des autres bactériocines, par la présence de résidus lanthionine et 3'-méthyllanthionine (**Figure I. 5a**). La lanthionine et la 3'-méthyllanthionine, résultent respectivement de la formation d'un pont thioéther entre une cystéine libre et un acide aminé déshydraté, la didéhydroalanine (Dha) et la 2, 3-didéhydrobutyrine (Dhb). La Dha et la Dhb sont respectivement formées par déshydratation de la sérine et de la thréonine (**Figure I. 5b**).

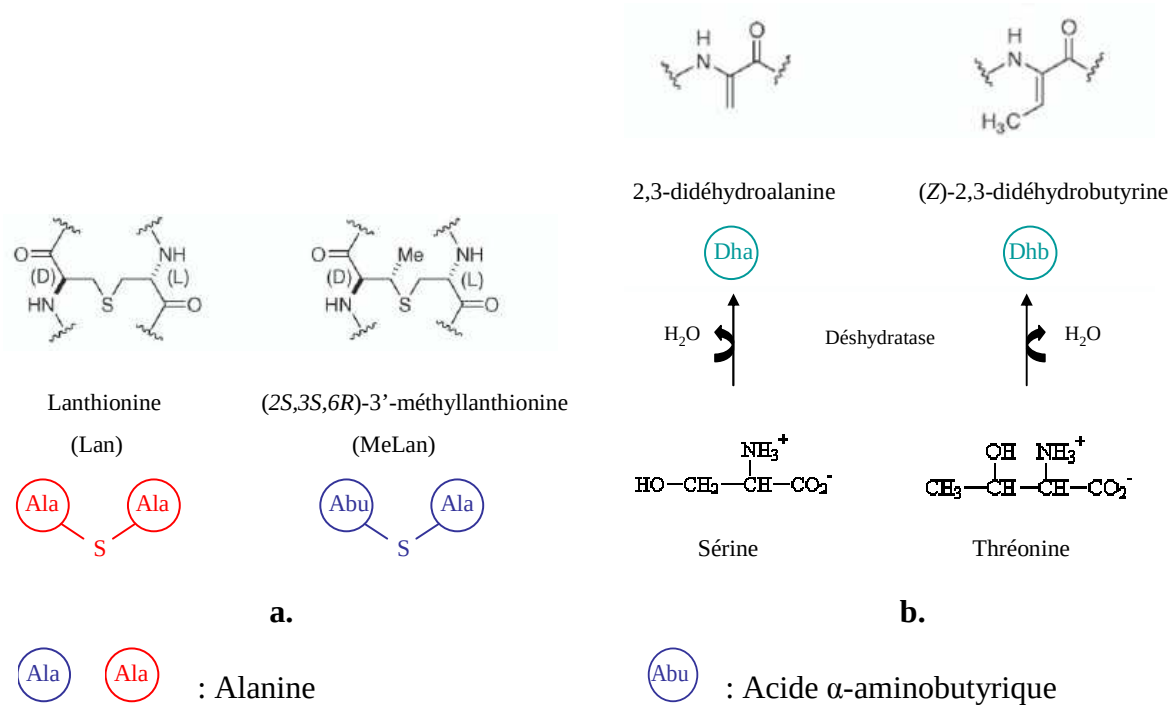


Figure I. 5. Structures des résidus modifiés communs aux lantibiotiques et résultant de modifications post-traductionnelles.

Les lantibiotiques sont actifs contre de nombreuses bactéries pathogènes, comme *Listeria* ou *Salmonella*, responsables d'infections. Cette particularité permet aux lantibiotiques d'être utilisés comme conservateurs alimentaires (Cotter *et al.*, 2005b).

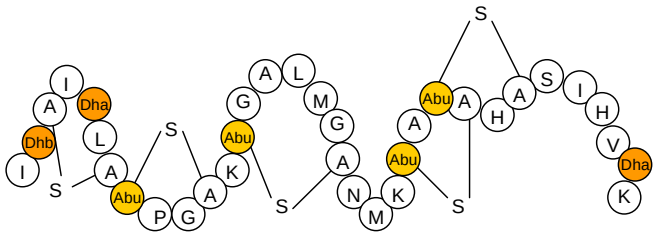
Le système génétique impliqué dans la biosynthèse et la régulation de la biosynthèse des lantibiotiques est, le plus souvent, présent sous forme de groupes de gènes (clusters). Ces

clusters ont été largement étudiés ces dernières années (Bierbaum et Sahl, 2009, Jack *et al.*, 1998, Sahl et Bierbaum, 1998).

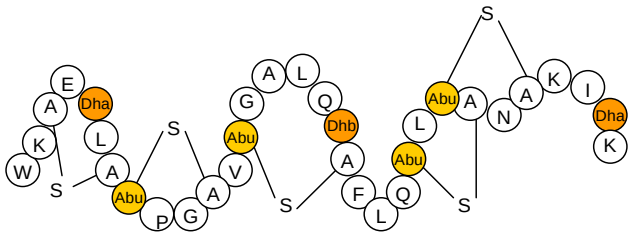
III.1. Structure

Les lantibiotiques ont été classés en fonction de leur structure par Günther Jung (Jung, 1991) en deux types principaux : le type A (ex. nisine) et le type B (ex. mersacidine) (Jung, 1991). Depuis, d'autres groupes de lantibiotiques comme le type C ont été proposés (Booth *et al.*, 1996, Heng *et al.*, 2007a).

La nisine A



La subtiline



L'épidermine

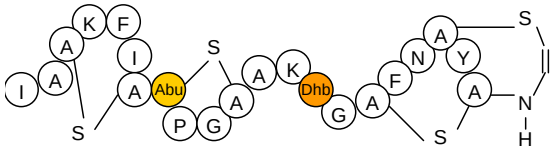
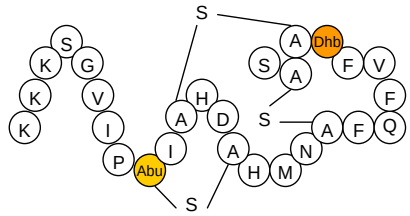


Figure I. 6a. Structures de lantibiotiques de type A I.

Dha : didéhydroalanine.
Dhb : didéhydrobutyrine.
Abu : acide α-aminobutyrique.
A-S-A : lanthionine.
Abu-S-A : 3'-méthyllanthionine.
A-S-CH=CH-NH : S-[(Z)-2-aminovinyl]-(3S)-3-méthyl-D-cystéine.

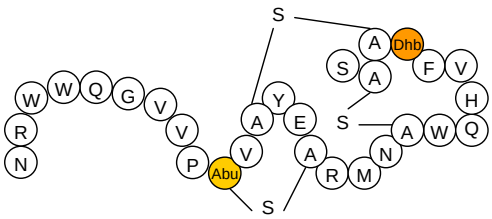
Le type A regroupe les lantibiotiques linéaires chargés positivement (Twomey *et al.*, 2002). Les déshydratases catalysent la formation de la lantionine et de la 3'-méthyllantionine par la formation de ponts thioéthers. Cette réaction résulte de la réaction d'un groupement thiol de la cystéine avec un acide aminé insaturé la Dha ou la Dhb. Le type A est subdivisé en deux sous-groupes, A I et A II (**Figure I. 6**), en fonction de leur structure. Les lantibiotiques du groupe A I (nisine, subtiline, épidermine) possèdent uniquement une structure linéaire.

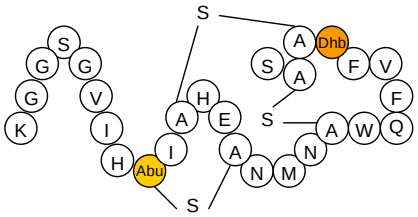
Le groupe A II (nukacine ISK-1, mutacine II, lacticine 481) regroupe les lantibiotiques formés d'une région *N*-terminale linéaire et d'une région *C*-terminale globulaire renfermant les ponts lanthionines (Nagao *et al.*, 2006). Contrairement aux lantibiotiques du groupe A I, ceux du groupe A II sollicitent une enzyme unique (LanM) pour catalyser la formation de la lanthionine et la 3'-méthyllantionine (Nagao *et al.*, 2006).



La nukacine ISK-1

La mutacine II





La lacticine 481

Figure I. 6b. Structures de lantibiotiques de type A II.

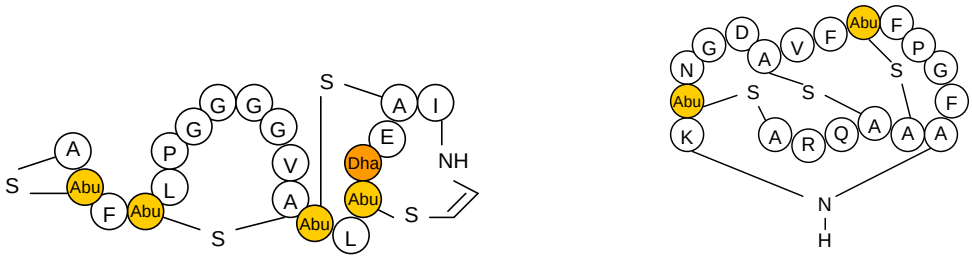
Dha : didéhydroalanine.

Abu : acide α-aminobutyrique.

A-S-A : lanthionine.

Abu-S-A : 3'-méthyllanthionine.

Les lantibiotiques de type B (**Figure I. 7**) ont une structure globulaire (Twomey *et al.*, 2002). Pour former la lantionine et la 3'-méthyllantionine, le groupement thiol d'une cystéine réagit respectivement avec la Dha et la Dhb conférant une structure globulaire et compacte à ce groupe de lantibiotiques.



La mersacidine

La cinnamycine

Figure I. 7. Structures de lantibiotiques de type B.

Dha : didéhydroalanine.

Dhb : didéhydrobutyrine.

Abu : acide α-aminobutyrique.

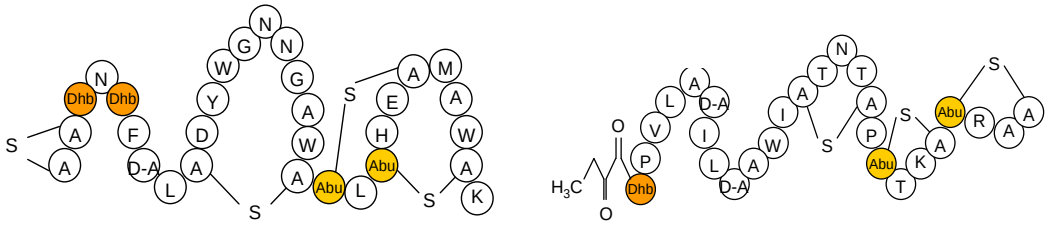
D-A : D-alanine.

A-S-A : lanthionine.

Abu-S-A : 3-méthyllanthionine.

Abu–S-CH=CH-NH : S-[(Z)-2-aminovinyl]-D-cystéine.

Un troisième groupe renferme les lantibiotiques « two-peptides » formés de deux peptides agissant en synergie. Ce groupe renferme des lantibiotiques comme la lacticine 3147 (Martin *et al.*, 2004) (**Figure I. 8**), la staphylococcine C55 (Navaratna *et al.*, 1999) et l'haloduracine (Cooper *et al.*, 2008).



La lacticine 3147 A1
(LtnA1)

La lacticine 3147 A2
(LtnA2)

Figure I. 8. Structure d'un lantibiotique « two-peptides » : la lacticine 3147.

Dhb : didéhydrobutyrine.

Abu : acide α-aminobutyrique.

D-A : D-alanine.

A-S-A : lanthionine.

Abu-S-A : 3-méthyllanthionine.

Le mécanisme moléculaire à l'origine de l'action synergique de ces lantibiotiques est encore mal connu à ce jour (Asaduzzaman et Sonomoto, 2009, McAuliffe *et al.*, 2000).

De nombreux nouveaux lantibiotiques ont plus récemment été découverts comme la nisine Q (Zendo *et al.*, 2003), la streptine (Wescombe et Tagg, 2003), la bovisine (Xiao *et al.*,

2004) et la thermophiline 1277 (Kabuki *et al.*, 2009) qui est avec la sublancine 168 (Dorenbos *et al.*, 2002, Paik *et al.*, 1998) (**Figure I. 9**) un lantibiotique possédant un pont disulfure.

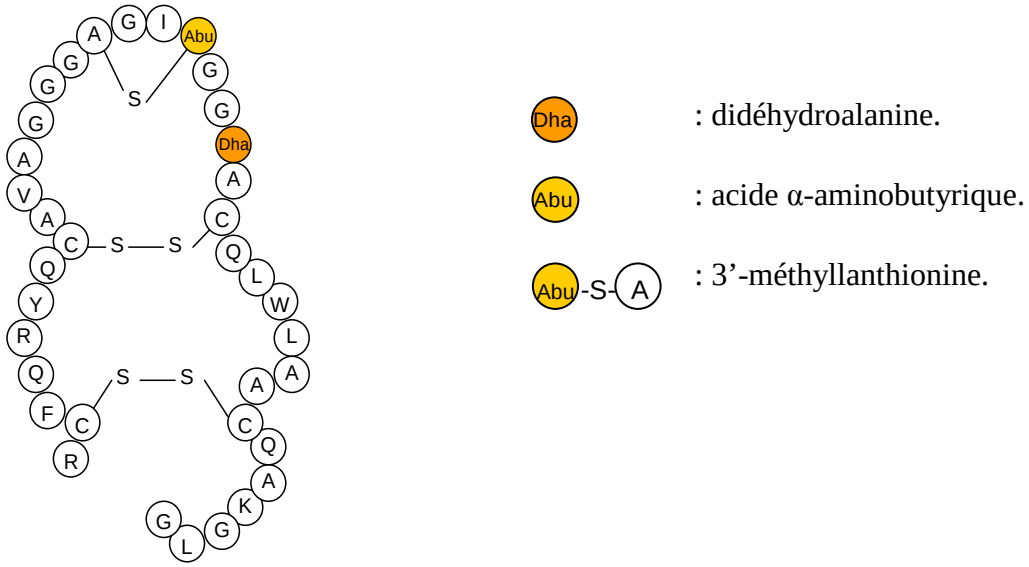
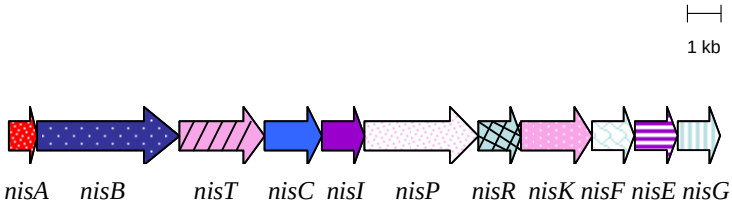


Figure I. 9. Structure d'un lantibiotique non classé possédant deux ponts disulfure : la sublancine 168.

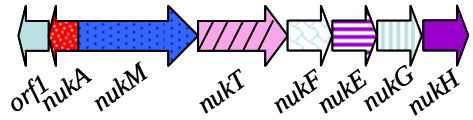
III.2. Biosynthèse

Les gènes impliqués dans la biosynthèse sont organisés en clusters dont le locus est symbolisé par *lan* (Asaduzzaman et Sonomoto, 2009) (**Figure I. 10**). Le système génétique impliqué dans la production des lantibiotiques est retrouvé sur le chromosome (subtiline) (Banerjee et Hansen, 1988), sur un plasmide (nukacine) (Aso *et al.*, 2004a) ou sur des éléments transposables présents sur le chromosome (nisine) (Buchman *et al.*, 1988).

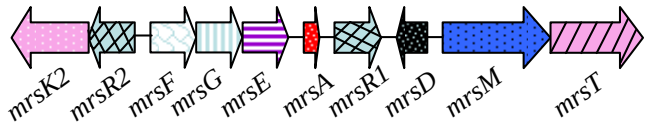
Le système génétique codant la nisine est le plus étudié et le mieux connu (Kuipers *et al.*, 1993). Il est symbolisé par *nis* (Lubelski *et al.*, 2008). Pour les lantibiotiques, le gène *lanA* (*nisA* pour la nisine) code le peptide immature ou peptide précurseur composé de 23 à 59 acides aminés (57 acides aminés pour la nisine). Le peptide précurseur est inactif et serait impliqué dans la protection de la souche productrice, mais son rôle précis demeure mal connu (van der Meer *et al.*, 1994).



a. : Lantibiotique de type A I : la nisine produite par *Lc. lactis.*



b. : Lantibiotique de type A II : la nukacine ISK-1 produite par *Sta. warneri* ISK-1



c. : Lantibiotique de type B : la mersacidine produite par *Bacillus* sp. strain HIL Y-85,54728.

Figure I. 10. Organisation génétique des clusters de gènes impliqués dans la biosynthèse et la régulation de la biosynthèse des lantibiotiques.

Production

Lan	: précurseur.
LanB, C, D, M	: enzymes responsables des modifications post-traductionnelles.
LanT	: ABC-transporteur (contenant un site de liaison à l'ATP.
LanP	: enzyme responsable du clivage du peptide signal du précurseur (peut être associé à NisT).

Immunité

NisI/ NukH	: protéine d'immunité de la souche productrice.
LanF, E, G	: ABC-transporteur responsable de l'immunité de la souche productrice.

Régulation (système à 2 composants)

LanK	: kinase.
LanR	: régulateur de réponse.

Chez les lantibiotiques de type A I, les gènes *lanB* (*nisB*) et *lanC* (*nisC*) (**Figure I. 10**) codent respectivement la déshydratase Lan B (NisB) et la cyclase LanC (NisC) impliquées dans les modifications post-traductionnelles du peptide précurseur. LanB (NisB) est responsable de la déshydratation de la sérine et de la thréonine respectivement en Dha et Dhb (**Figure I. 11**) (de Vos *et al.*, 1995, Sahl *et al.*, 1995).

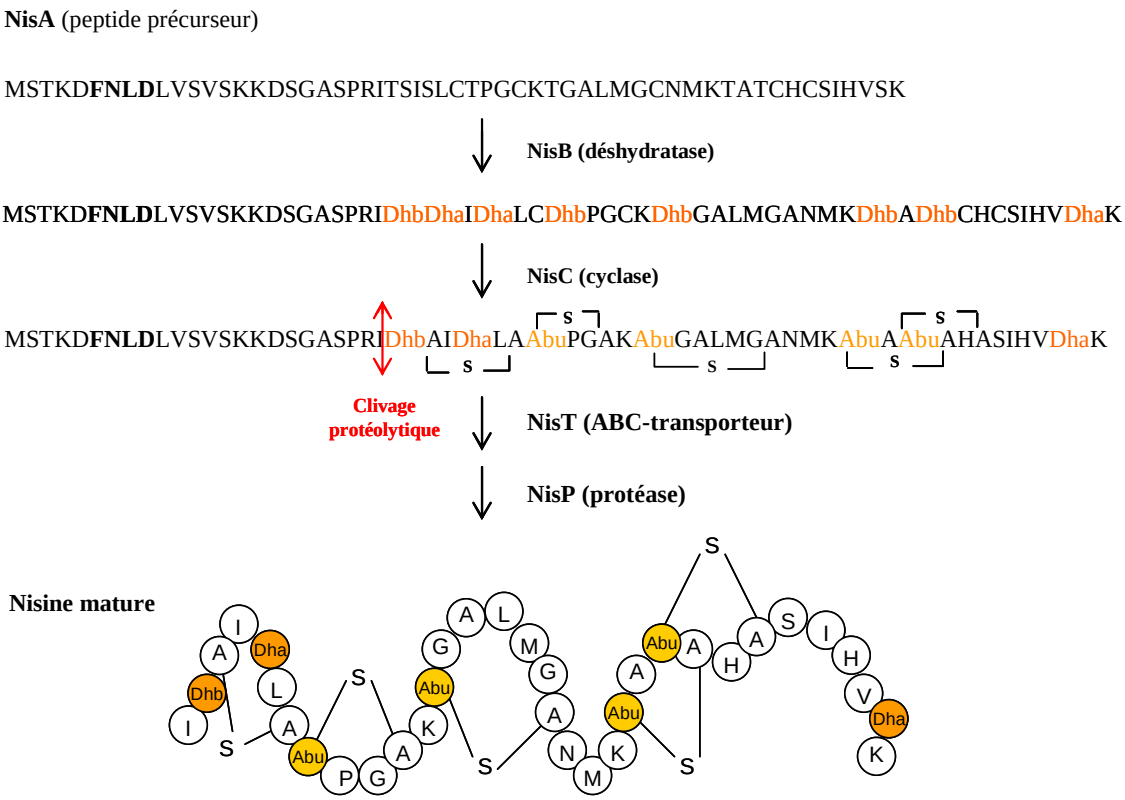


Figure I. 11. Voies de modifications post-traductionnelles et d'export d'un lantibiotique de type A I : la nisine.

Dha : déhydroalanine.
Dhb : déhydrobutyrine.
Abu : acide α-aminobutyrique.
A-S-A : lanthionine.
Abu-S-A : 3'-méthyllanthionine.

La séquence consensus (**FNDL**) est représentée en gras.

LanC (NisC) est une métalloprotéine à zinc portant des résidus histidine et cystéine conservés responsables de la fixation du zinc (Koponen *et al.*, 2002, Okeley *et al.*, 2003). Le zinc est impliqué dans la formation du pont thiol par l'addition de résidu cystéine à la Dha et la Dhb générant la lanthionine et la 3'-méthyllanthionine.

Le gène *lanM* est présent chez les bactériocines de type A II et de type B (*nukM* chez la nukacine et *mrsM* chez la mersacidine) et code LanM (**Figure I. 12**), une enzyme combinant les actions de déshydratase et de cyclase (Chatterjee *et al.*, 2005a, Xie et van der Donk, 2004).

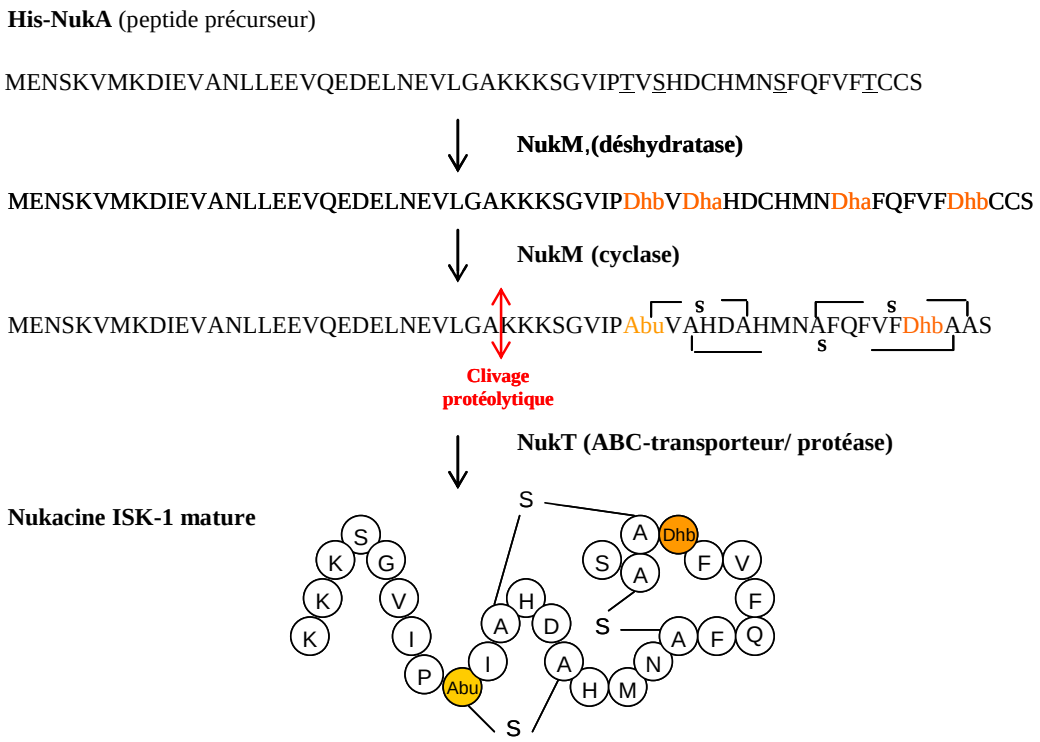


Figure I. 12. Voies de modifications post-traductionnelles d'un lantibiotique de type A II : la nukacine ISK-1.

Dhb : déhydrobutyrine.

Abu : acide α-aminobutyrique.

A-S-A : lanthionine.

Abu-S-A : 3'-méthyllanthionine.

Comme LanC, LanM nécessite la présence d'un cofacteur métallique, le zinc, pour être fonctionnelle. Sa région *C*-terminale partage 20 à 27% d'identité en acides aminés avec celle de LanC comprenant l'histidine et la cystéine impliquées dans la fixation du zinc (Chatterjee *et al.*, 2005a). Il n'existe, cependant, aucune homologie de séquence avec LanB. Cependant, LanB, LanC et LanM ne sont pas responsables de toutes les modifications post-traductionnelles que peuvent subir les lantibiotiques. En effet, la cystéine amino-vinylée présente chez la mersacidine et l'épidermine résulte d'une décarboxylation oxydative d'une cystéine du côté *C*-terminal, catalysée respectivement par les enzymes MrsD et EpiD (**Figure I. 13**) (Blaesse *et al.*, 2003, Majer *et al.*, 2002, Schmid *et al.*, 2002).

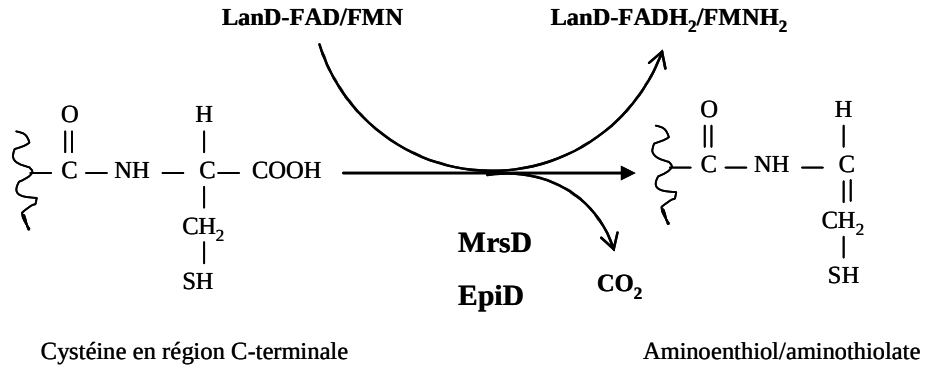


Figure I. 13. Décarboxylation oxydative d'une cystéine en aminoenthiol/ aminoenthiolate lors de la biosynthèse de la mersacidine et de l'épidermine.

MrsD : Enzyme catalysant la décarboxylation oxydative chez la mersacidine.
EpiD : Enzyme catalysant la décarboxylation oxydative chez l'épidermine.

D'autre part, la thio-disulfure oxydoréductase BdbB est essentielle à la formation du pont disulfure chez la sublancine 168. Cette dernière s'avère être le seul lantibiotique à posséder deux ponts disulfure (Dorenbos *et al.*, 2002), la thermophiline 1277 renfermant un seul pont disulfure (Kabuki *et al.*, 2009).

Des modifications post-traductionnelles peu communes ont été reportées chez la cinnamycine produite par *Streptomyces cinnamoneus*. Cette modification post-traductionnelles est à l'origine de la lysinalanine et la β-hydroxy aspartate présentes chez ce lantibiotique. Cependant, les enzymes impliquées dans ces modifications post-traductionnelles sont encore peu connues. Le séquençage du cluster de gènes codant la cinnamycine pourrait permettre de les identifier (Widdick *et al.*, 2003).

Après avoir subi les modifications post-traductionnelles, les peptides précurseurs de type A I sont transportés dans le milieu extracellulaire via un transporteur ABC, LanT (NisT pour la nisine), puis hydrolysés par une protéase à sérine, LanP (NisP) (**Figure I. 11**, **Figure I. 14**).

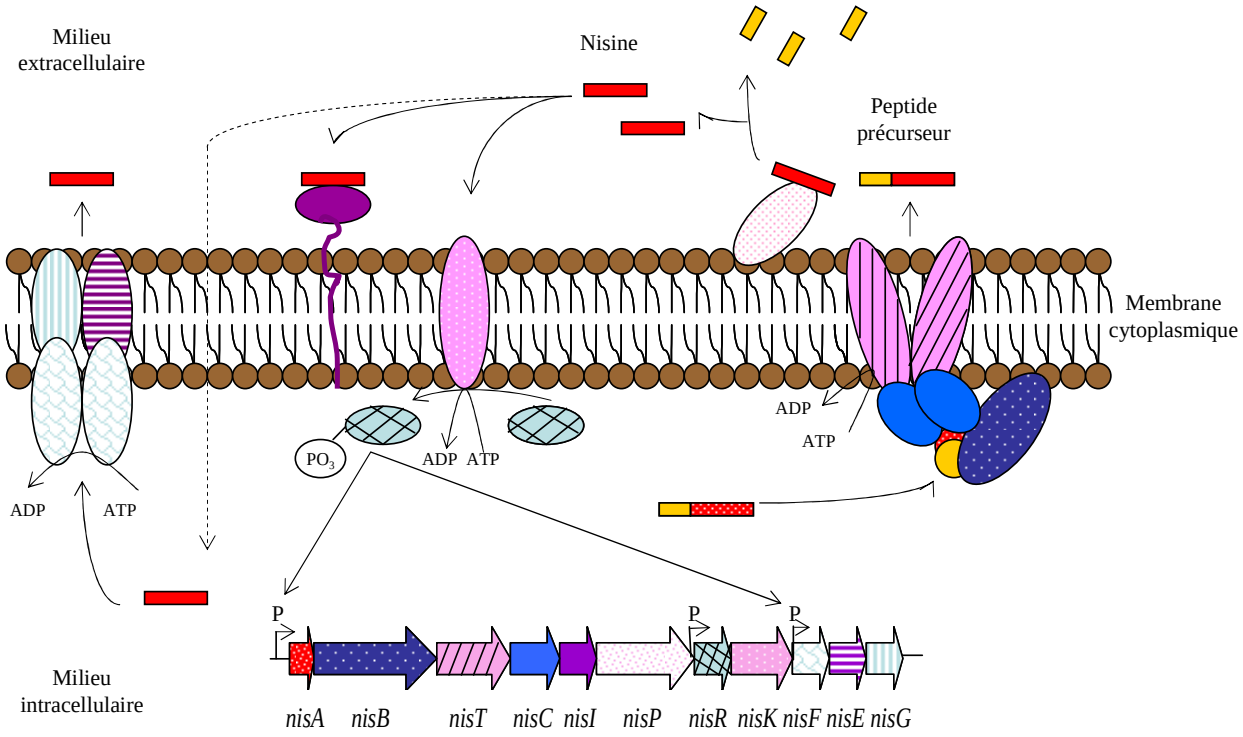


Figure I. 14. Schéma de biosynthèse, de sa régulation et d'immunité de la souche productrice pour la nisine.

Production

NisA	: précurseur de la nisine.
NisB, C	: enzymes responsables des modifications post-traductionnelles.
NisT	: ABC-transporteur (contenant un site de liaison à l'ATP.
NisP	: enzyme responsable du clivage du peptide signal du précurseur (peut être associé à NisT).

Immunité

NisI	: protéine d'immunité de la souche productrice.
LanF, E, G	: ABC-transporteur responsable de l'immunité de la souche productrice.

Régulation

NisK	: kinase.
NisR	: régulateur de réponse.
	: peptide leader.
	: nisine mature.
P	: promoteur.

Les transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) constituent une famille de protéines membranaires très vaste (Higgins, 1992). Ces transporteurs utilisent l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP pour transporter une variété considérable de molécules (peptides, lipides, ions…) au travers des membranes cellulaires. En revanche, chez les lantibiotiques de type A II et de type B, LanT (NukT chez la nukacine et MrsT chez la mersacidine) possède

une double fonction. LanT catalyse à la fois le clivage protéolytique du peptide précurseur et l'export du peptide actif (Siegers et Entian, 1995) (**Figure I. 12**).

Dans le cas de la nisine, les gènes *nisI* et *nisFEG* (**Figure I. 10a**) codent des protéines d'immunité conférant à la souche productrice une protection complète contre sa propre production (Aso *et al.*, 2004a). *nisI* code une lipoprotéine ancrée dans la membrane cytoplasmique orientée du côté extracellulaire (**Figure I. 14**). *NisFEG* code un ABC transporteur qui joue le rôle de pompe d'efflux. NisFEG permet la translocation du lantibiotique vers le milieu extracellulaire, lorsque ce dernier réussit à traverser la membrane plasmique de la bactérie productrice (Stein *et al.*, 2003, Stein *et al.*, 2005) (**Figure I. 14**).
NisI fixe le lantibiotique via des interactions hydrophobes, l'empêchant ainsi de pénétrer dans la bactérie productrice. La protection engendrée par NisI est plus efficace que celle réalisée par NisFEG seul (Lubelski *et al.*, 2008).

Certains lantibiotiques possèdent uniquement LanI (la pep5 et l'épicidine) ou LanFEG (la mersacidine) et d'autre possèdent les deux protéines d'immunité (la nisine et la nukacine ISK-1), conférant ainsi une immunité totale à leur hôte (Nagao *et al.*, 2006). Les gènes codant les protéines d'immunité LanI et LanFEG sont homologues entre les souches productrices de lantibiotiques. Ceci est étonnant car chaque souche productrice devrait être capable de produire une protéine d'immunité unique la protégeant exclusivement contre sa propre production (Nagao *et al.*, 2006). Ceci impliquerait l'existence d'un mécanisme de reconnaissance commun et donc l'existence de sensibilités croisées entre les souches phylogénétiquement proches productrices de lantibiotiques. Des études sont toujours en cours pour mieux comprendre le mode d'action de la protéine d'immunité et son mécanisme de reconnaissance vis-à-vis du lantibiotique.

III.3. Régulation de la biosynthèse chez les lantibiotiques

La production des lantibiotiques est régulée au niveau transcriptionnel en fonction de la quantité de lantibiotique présent dans le milieu. Les deux modèles de régulation les plus étudiés sont retrouvés chez la nisine et la subtiline produites respectivement par *Lc. lactis* et *B. subtilis* (Engelke *et al.*, 1994, Klein *et al.*, 1993).

Le quorum sensing est un système d'autorégulation dans lequel les lantibiotiques jouent le rôle de phéromones pour leur propre production. Lorsqu'il est présent en quantité

suffisante dans le milieu extracellulaire, le lantibiotique induit sa propre transcription (de Ruyter *et al.*, 1996, Engelke *et al.*, 1994, Kuipers *et al.*, 1995).
Lorsqu'elles sont présentes dans le milieu extracellulaire, la nisine et la subtiline activent leur propre production via un système de régulation à deux composants LanR-LanK (Engelke *et al.*, 1994, Klein *et al.*, 1993).

Dans le cas de la nisine, la transcription de *nisA* est parfaitement autorégulée par *nisRK*. La nisine est capable d'induire la transcription de son propre gène par NisR-NisK via un signal de transduction (Engelke *et al.*, 1994, Kuipers *et al.*, 1995). Une fois activée par un signal extracellulaire engendré par la nisine, NisK auto-phosphoryle un résidu histidine qui phosphoryle à son tour un résidu aspartate de NisR. NisR phosphorylée change de conformation et induit la transcription du gène *nisA* ainsi que celle des gènes *nisFEG* (**Figure I. 13**). Dans ce type de régulation, la nisine joue à la fois le rôle de la phéromone qui induit le signal de transduction et celui du peptide antimicrobien lui-même (de Ruyter *et al.*, 1996, Kuipers *et al.*, 1995). La séquence promotrice ainsi que le nucléotide +1 (« start ») de la transcription de *nisA* ont été identifiés chez la souche *Lc. lactis* NZ9700 (Engelke *et al.*, 1992, Kuipers *et al.*, 1993). Il a été démontré que le promoteur de *nisA* contrôlait la transcription de *nisTCIP* mais pas *nisRK* (Immonen *et al.*, 1995). L'expression des gènes *lanR* et *lanK* est indépendante de la nisine, ce qui permet d'assurer la production de protéines impliquées dans la transduction du signal même en absence de nisine.

D'autres systèmes de régulation ont été identifiés chez les lantibiotiques. Le premier régulateur à 'effet négatif' a été identifié pour la lacticine 3147 (McAuliffe *et al.*, 2001). La protéine régulatrice de la lacticine 3147, LtnR, joue le rôle d'un répresseur et permet le maintien d'un rapport correct entre l'ARNm du précurseur et des autres protéines impliquées dans la biosynthèse du lantibiotique (McAuliffe *et al.*, 2001).

La mersacidine possède un système de régulation différent de ceux déjà présentés. Ce dernier comporte un système à deux composants MrsR2/K2 et une protéine régulatrice MrsR1 (Guder *et al.*, 2002). MrsK2 est une protéine histidine kinase et MrsR2 est une protéine régulatrice OmpR-like (Altena *et al.*, 2000). MrsR2/K2 activent la transcription de *mrsFGE* (**Figure I. 10c**) codant le transporteur ABC impliqué dans l'immunité de la souche contre sa propre production (Guder *et al.*, 2002). MrsR1 est une protéine régulatrice, qui présente un faible taux d'homologie avec les protéines OmpR-like. Elle active la transcription du gène *mrsA*, favorisant ainsi la production de le mersacidine (Guder *et al.*, 2002).

Seule la plantaricine produite par *Lb. plantarum* possède un système de régulation similaire à celui de la mersacidine. La plantaricine possède trois protéines régulatrices PlnB, PlnC et PlnD. PlnC et PlnD jouent respectivement le rôle d'activateur de production de la bactériocine et de répresseur. La PlnB est une protéine kinase (Diep *et al.*, 1996, Diep *et al.*, 2001).

Chez l'épidermine, seule la protéine LanR (EpiQ) est présente (Peschel *et al.*, 1993). Enfin, la biosynthèse de la lacticine 481 n'implique pas LanK-LanR. La production de ce lantibiotique est stimulée par l'acidification du milieu due à la production d'acide lactique. Cet acide activerait un régulateur non spécifique RcfB qui activerait, à son tour, la biosynthèse de la lacticine 481 (Chatterjee *et al.*, 2005b, Dufour *et al.*, 2007).

La régulation de l'expression des gènes chez les bactéries est basée sur le niveau de transcription et plus précisément sur la capacité de fixation de l'ARN polymérase aux sites promoteurs. L'ARN polymérase est une holoenzyme composée d'un « cœur » contenant trois sous-unités et d'une protéine supplémentaire appelée facteur σ. Découvert pour la première fois chez *B. subtilis* (Dubnau, 1991, Duffy et Geiduschek, 1975), le facteur σ permet la reconnaissance des sites promoteurs par l'holoenzyme, initiant ainsi la transcription (deHaseth *et al.*, 1978, Hinkle et Chamberlin, 1972). Il existe plusieurs familles de facteurs σ (σ^{70}, σ^{54}, σ^{32},…) chez les bactéries (Helmann et Chamberlin, 1988, Lonetto *et al.*, 1992) qui, en fonction des conditions environnementales, reconnaissent des séquences différentes spécifiques à chaque promoteur de gènes. Il a été montré que la production de la subtiline par *B. subtilis*, en fin de phase stationnaire, est associée au facteur σH (Haldenwang, 1995, Lonetto *et al.*, 1992). De plus, SpaR (LanR) et SpaK (LanK) impliqués dans la régulation de la biosynthèse de la subtiline seraient fortement dépendants de σH (Stein *et al.*, 2002). Ainsi, l'absence de σH provoquerait un arrêt de la production de subtiline (Stein *et al.*, 2002). Cependant, σH semble ne pas avoir d'effet sur la régulation de la biosynthèse de la mersacidine, un autre lantibiotique produit également en fin de phase stationnaire (Schmitz *et al.*, 2006).

III.4. Mode d'action

Les lantibiotiques ont principalement la membrane cytoplasmique pour cible. Pour les lantibiotiques, l'effet antimicrobien est le résultat à la fois de la perméabilisation de la membrane cytoplasmique et de l'inhibition de la biosynthèse de la paroi bactérienne ou de

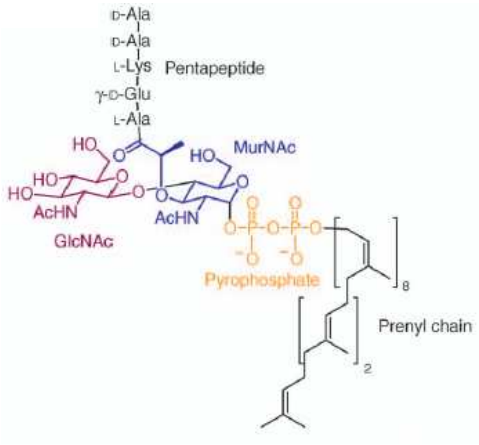
l'inactivation d'une enzyme essentielle à la biosynthèse de la paroi bactérienne (Chatterjee *et al.*, 2005a, Twomey *et al.*, 2002).

L'enveloppe des bactéries à Gram positif est composée d'une paroi, en contact direct avec le milieu extérieur, formée de peptidoglycanes (ou muréine), d'un espace périplasmique et d'une membrane cytoplasmique. Le peptidoglycane est composé d'une partie glucidique formé d'un polymère d'unités disaccharidique d'acide N-acétylmuramique (MurNAc) lié en β (1→4) à un résidu de N-acétylglucosamine (GlcNAc). Les polysaccharides sont liés entre eux au niveau du MurNac par des chaînons pentapeptidiques dont la séquence varie en fonction des bactéries (Prescott *et al.*, 2003). Chez *Li. monocytogenes* la séquence peptidique de ces chaînons est : L-Ala, D-Glu, L-Lys, D-Ala, D-Ala. Contrairement aux bactéries à Gram positif, le peptidoglycane chez les bactéries à Gram négatif est plus fin et enchâssé entre deux membranes plasmiques : la membrane externe composée de phospholipides, de nombreuses protéines intrinsèques, notamment les protéines de transport appelées porines, ainsi qu'un composé non protéique appelé lipopolysaccharide (LPS). Les bactéries à Gram négatif telles que *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium* et *Serratia marcescens* sont résistantes aux lantibiotiques et en particulier à la nisine (Chung *et al.*, 1989, Linnett et Strominger, 1973). Cette résistance a été attribuée à la membrane externe riche en LPS qui empêche les bactériocines d'accéder pentapeptide du lipide II présent dans la membrane cytoplasmique (Chatterjee *et al.*, 2005a, Gänzle *et al.*, 1999). Cependant il a été montré que *Pectinatus frisingensis*, un pathogène responsable de la contamination de la bière, était sensible à la nisine. La résistance de cette bactérie à la nisine apparait après exposition répétée au lantibiotique. Contrairement aux autres bactéries à Gram négatif, la résistance à la nisine résulte d'une modification de la nature des acides gras, et en particulier d'une augmentation de la proportion des acides gras saturés composant la membrane cytoplasmique de la bactérie (Chihib et Tholozan, 1999).

III.4.1. Le double mécanisme d'action

La perméabilisation de la membrane cytoplasmique par formation de pores conduit à la mort de la bactérie cible après dissipation d'ions intracellulaires. L'exemple de mécanisme d'action le mieux connu est celui de la nisine et de différents lantibiotiques de type A I (subtiline et épidermine) et de type A II (lacticine 481, nukacine ISK-1) (**Figure I. 6**).
Un premier contact est initié entre la nisine et la membrane cytoplasmique de la bactérie cible via des interactions électrostatiques (Ruhr et Sahl, 1985). Chargée positivement, la région *C*-

terminale de la nisine interagit (Breukink *et al.*, 1997, Giffard *et al.*, 1997) avec la membrane cytoplasmique de la bactérie cible fortement anionique (Breukink *et al.*, 1997). Les boucles formant la lanthionine et la 3'-méthyllanthionine situées au niveau de la région *N*-terminale interagissent avec le disaccharide-pyrophosphate du lipide II (**Figure I. 15**), précurseur de la biosynthèse de la paroi bactérienne (Asaduzzaman *et al.*, 2006).



GlcNAc : *N*-acétylglucosamine.

MurNAc : Acide *N*-acétylmuramique.

Figure I. 15. Structure du lipide II.

Il existe des mécanismes d'action engendrant la formation de pores transmembranaires, le modèle 'barrel-stave' (Gao *et al.*, 1991) et le modèle 'wedge' (Driessen *et al.*, 1995).

Dans le premier modèle, les monomères de nisine, cationiques interagissent avec la membrane cytoplasmique via des interactions électrostatiques. Se positionnant perpendiculairement à la membrane bactérienne, les monomères s'agrègent et forment ainsi des pores (Gao *et al.*, 1991). Cependant ces pores sont instables et transitoires en raison de forces hydrophobes qui, via des réarrangements, reconduisent les lipides membranaires à leur position initiale.

Dans le modèle 'wedge', la nisine adopte une position initiale parallèle à la membrane plasmique. L'interaction de la nisine avec le lipide II via des liaisons hydrogène aboutit à la formation d'un complexe nisine-lipide II (Breukink *et al.*, 1999). Respectant la surface membranaire, le lipide II fait passer l'orientation de la nisine de parallèle à perpendiculaire à la membrane plasmique (**Figure I. 16**) (van Heusden *et al.*, 2002).

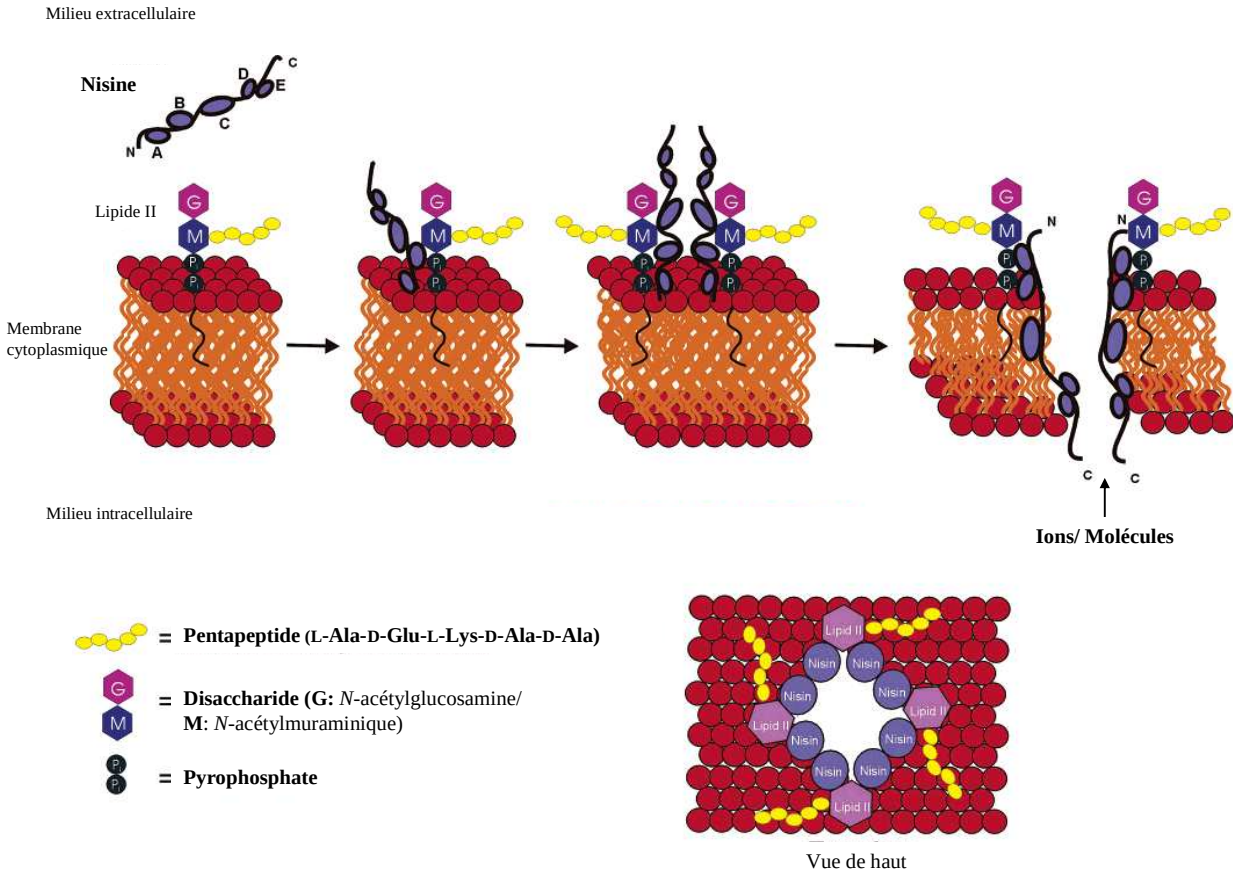


Figure I. 16. Formation de pores membranaires par le complexe nisine-lipide II selon Chatterjee C. *et al.* (Chatterjee *et al.*, 2005a).

L'extrémité *C*-terminale, libre, s'insère dans la membrane plasmique formant ainsi un pore stable, unique et de structure uniforme dans la membrane plasmique (Breukink *et al.*, 2003). Ce pore hétéromoléculaire est constitué de 8 molécules de nisine et 4 molécules de lipide II (Chatterjee *et al.*, 2005a) (**Figure I. 16**). Ce modèle est retrouvé pour la subtiline et l'épidermine (Bonelli *et al.*, 2006, Breukink et de Kruijff, 2006). En s'insérant dans la membrane cytoplasmique, le complexe nisine-lipide II engendre un encombrement stérique inhibant la synthèse des peptidoglycanes. La nisine possède ainsi une double action sur les bactéries cibles : formation de pores hétéromoléculaires nisine-lipide II et inhibition de la synthèse du peptidoglycane (Brötz *et al.*, 1998b, Chatterjee *et al.*, 2005a).

Les lantibiotiques « two-peptides » tels que la lacticine 3147 (**Figure I. 8**) utilisent aussi le lipide II pour former des pores dans la membrane des bactéries cibles. Mais à la différence de la nisine, le mécanisme d'action se fait en deux étapes. Le LtnA1 (peptide α) interagit d'abord avec le lipide II. Une fois le complexe LtnA1-lipide II formé, le LtnA2 (peptide β) est recruté aboutissant ainsi à la formation de pores et à l'inhibition de la synthèse

de la paroi bactérienne (Breukink et de Kruijff, 2006, Morgan *et al.*, 2005, Wiedemann *et al.*, 2006).

Il a été démontré que les lantibiotiques de type A II (lacticine 481, nukacine ISK-1, mutacine II) interagissaient aussi avec le lipide II aboutissant à la formation de pores dans la membrane plasmique ainsi qu'à l'inhibition de la biosynthèse de la paroi bactérienne (Asaduzzaman *et al.*, 2006, Wiedemann *et al.*, 2001).

III.4.2. Inhibition de synthèse de la paroi bactérienne

Contrairement aux lantibiotiques de type A, les lantibiotiques de type B perturbent des réactions enzymatiques impliquées dans la croissance de la bactérie cible, compromettant ainsi sa survie (Brötz *et al.*, 1995, Brötz *et al.*, 1997). Ainsi, la mersacidine agit en se liant au lipide II et en inhibant la transglycosylation, étape clé de la biosynthèse de la paroi bactérienne (Brötz *et al.*, 1998a, Brötz *et al.*, 1998b).
La cinnamycine, inhibe la phospholipase A2 en séquestrant son substrat, la phophatidyléthanolamine (PE) (Chatterjee *et al.*, 2005a, Märki *et al.*, 1991). Insérée dans la membrane cytoplasmique, la cinnamycine interagit avec le PE via des interactions d'abord électrostatiques puis hydrophobes séquestrant ainsi le substrat de la phospholipase A2 (Chatterjee *et al.*, 2005a, Kessler *et al.*, 1991).

IV. Les bactériocines de classe II

La classe II forme un groupe relativement hétérogène de peptides de masses moléculaires < 10 kDa. Contrairement aux lantibiotiques, les bactériocines de classe II ne présentent pas de modifications post-traductionnelles. La classe II peut être subdivisée en quatre sous-classes IIa à IId qui seront décrites ci-après.

IV.1. La classe IIa

Les bactériocines de classe IIa sont aussi communément appelées bactériocines « pediocin-like » en référence à la pédiocine, une des premières bactériocines de la classe IIa caractérisées. Ces bactériocines sont produites, pour la plupart, par des bactéries lactiques et représentent le groupe de bactériocines de classe II le mieux étudié (Drider *et al.*, 2006,

Fimland *et al.*, 2005). Les bactériocines de classe IIa ont suscité beaucoup d'intérêt en raison de leur production par des bactéries isolées de l'alimentation et ce, combiné à une activité antimicrobienne dirigée contre des pathogènes majeurs responsables d'infections, tels que *Li. monocytogenes*. De façon générale, les bactériocines « pediocin-like » présentent un spectre d'activité étroit limité aux bactéries à Gram positif. Depuis la découverte de nombreuses bactériocines pendant les années 90, telles que la curvacine A (Tichaczek *et al.*, 1993)/ sakacine A (Axelsson et Holck, 1995, Holck *et al.*, 1992), la leucocine A (Hastings *et al.*, 1991), la mésentéricine Y105 (Fleury *et al.*, 1996, Héchard *et al.*, 1992), la pédiocine PA-1 (Henderson *et al.*, 1992) et la sakacine P (Hühne *et al.*, 1996, Tichaczek *et al.*, 1994), de nombreuses nouvelles bactériocines ont été découvertes et sont régulièrement découvertes, comme la mundticine L (Feng *et al.*, 2009) et l'avicine A (Birri *et al.*, 2010).

Les bactériocines de classe IIa sont des peptides antimicrobiens cationiques et partiellement amphipathiques et/ ou hydrophobes de masse moléculaire inférieure à 5500 Da. Elles sont constituées de 37 à 49 acides aminés. La structure primaire des bactériocines de classe IIa est formée d'une région *N*-terminale conservée portant une séquence consensus et d'une région *C*-terminale variable (**Figure I. 17**). La région *N*-terminale cationique renferme une séquence consensus YGNG[V/L] (Tyr-Gly-Asn-Gly-Val/Leu) appelée la « pediocin-box » et deux cystéines formant un pont disulfure. Cette séquence consensus est le plus souvent YGNGV, mais la découverte de bactériocines de classe IIa telles que la bactériocine 31 (Tomita *et al.*, 1996), la plantaricine C19 (Atrih *et al.*, 2001b) et la sakacine 5X (Vaughan *et al.*, 2001) a permis de montrer que cette séquence consensus pouvait varier avec la substitution de la valine par la leucine. Cette différence n'a *a priori* aucun impact majeur sur la structure globale du peptide, les deux acides aminés présentant le même degré d'hydrophobie. Néanmoins, la chaîne latérale β-méthyl de la valine perturberait la torsion du squelette peptidique en modifiant les angles φ et ψ. La région *C*-terminale variable et hydrophobe renferme dans quelques cas un pont disulfure supplémentaire, comme c'est le cas de la divercine V41 et de la pédiocine PA-1,... (**Figure I. 17**). La présence d'un second pont disulfure dans la partie *C*-terminale conduirait à un spectre d'activité plus large et à une meilleure activité antimicrobienne (Eijsink *et al.*, 1998, Fimland *et al.*, 2000, Richard *et al.*, 2004). L'hétérogénéité de la région *C*-terminale a permis à Nissen-Meyer et coll. (Nissen-Meyer *et al.*, 2009) de sub-diviser les bactériocines de classe IIa en 4 sous-groupes présentés dans la **figure I. 17**. D'autres caractéristiques communes aux bactériocines de classe IIa sont la résistance aux hautes températures et l'effet antimicrobien associé à la présence d'au moins

un pont disulfure. Des bactériocines ne possédant pas la séquence consensus typique et le pont disulfure de la région *N*-terminale ont néanmoins été classées dans la classe IIa par certains auteurs (Belguesmia *et al.*, 2011, Ennahar *et al.*, 2000) : c'est le cas de l'acidocine A (Kanatani *et al.*, 1995) et de la bactériocine OR-7 (Stern *et al.*, 2006).

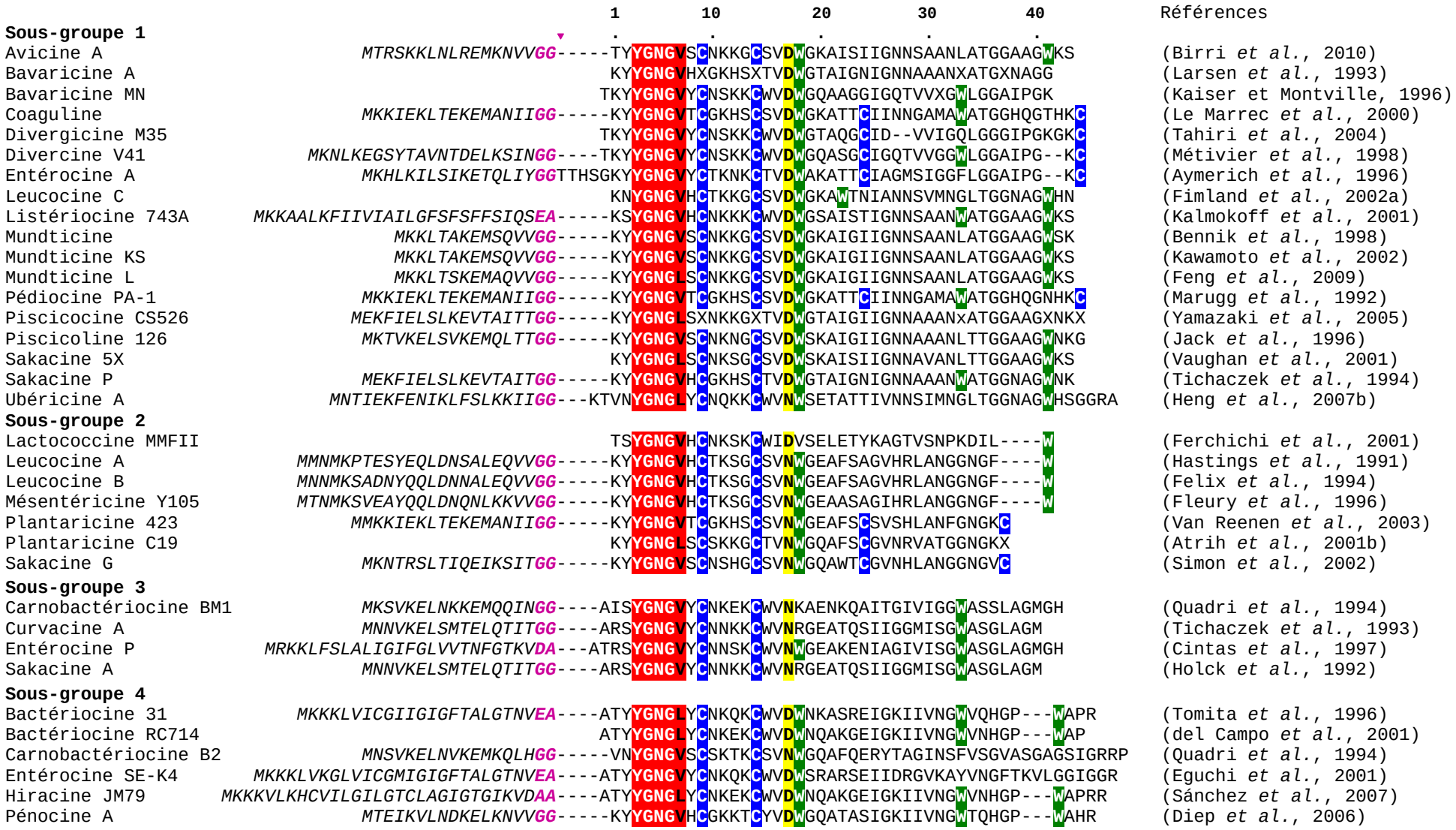


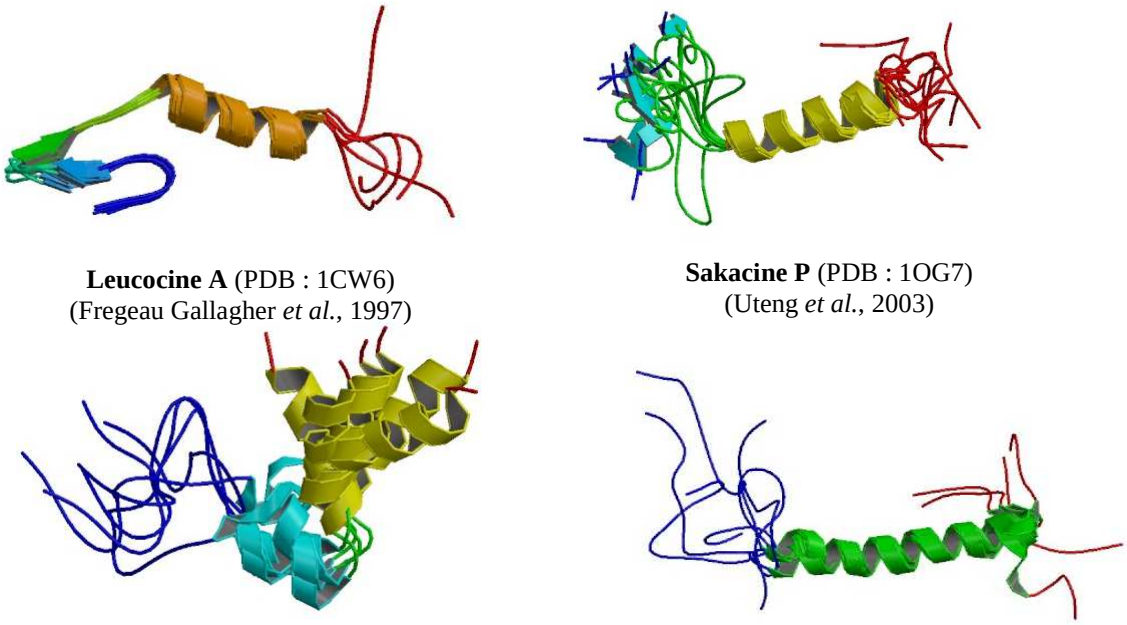
Figure I. 17. Alignement de séquences peptidiques de bactériocines de classe IIa d'après Nissen-Meyer J. et al. (Nissen-Meyer *et al.*, 2009).

La séquence spécifique au précurseur de la bactériocine est représentée en italique, le site de clivage (motif GG ou XA) est représenté en violet. La séquence consensus (YGNG[V/L]) est surlignée en rouge, les résidus cystéine (C) impliqués dans la formation des ponts disulfures sont surlignés en bleu, les résidus tryptophane (W) impliqués dans la stabilisation de la structure hélice-coude-hélice sont surlignés en vert et les résidus asparagine (N) et apsartate (D) formant le coude séparant la région *N*- de la région *C*-terminale sont surlignés en jaune.

▸ : Site de clivage.

IV.1.1. Structures tridimensionnelles

Les structures tridimensionnelles en solution de quatre bactériocines de classe IIa (cinq avec le variant de la curvacine A), la carnobactériocine B2 (Wang *et al.*, 1999), la curvacine A (Haugen *et al.*, 2005), la leucocine A (Fregeau Gallagher *et al.*, 1997) et la sakacine P (Uteng *et al.*, 2003) ont été déterminées par RMN en présence de structures mimant les membranes (**Figure 18**).



Leucocine A (PDB : 1CW6)
(Fregeau Gallagher *et al.*, 1997)

Sakacine P (PDB : 1OG7)
(Uteng *et al.*, 2003)

Curvacine A (PDB : 2A2B)
(Haugen *et al.*, 2005)

Carnobactériocine B2 (PDB : 1CW5)
(Wang *et al.*, 1999)

Figure I. 18. Structures tridimensionnelles de quelques bactériocines de classe IIa.

Des études par dichroïsme circulaire et par RMN ont révélé que les bactériocines de cette classe, n'étaient pas structurées en milieu aqueux et qu'elles étaient capables d'adopter leur structure tridimensionnelle seulement lorsqu'elles se trouvent en contact avec des structures membranaires ou mimant les membranes (Fregeau Gallagher *et al.*, 1997, Haugen *et al.*, 2005, Watson *et al.*, 2001). Les bactériocines de classe IIa se composent généralement d'une région *N*-terminale formant un feuillet β à trois brins stabilisé par le pont disulfure localisé en région *N*-terminale et d'une région *C*-terminale consistant en une ou deux hélices α (Kazazic *et al.*, 2002) formant une structure repliée en « épingle à cheveux » (Nissen-Meyer *et al.*, 2009).

Chez la leucocine A, la région *N*-terminale est structurée en un feuillet β antiparallèle à trois brins stabilisé par le pont disulfure localisé dans cette région et conservé chez toutes les

bactériocines de classe IIa. Les régions centrale et *C*-terminale plus hydrophobes comprennent une hélice α amphipathique (résidu 18 à 33) suivie d'une extension non structurée. L'hélice α centrale est conservée chez la carnobactériocine B2, la sakacine P et la curvacine A. Un coude présent entre les deux hélices formant une structure hélice-coude-hélice (« helix-hinge-helix ») introduit de la flexibilité et induit la topologie en « épingle à cheveux » (**Figure I. 18 et 19**).

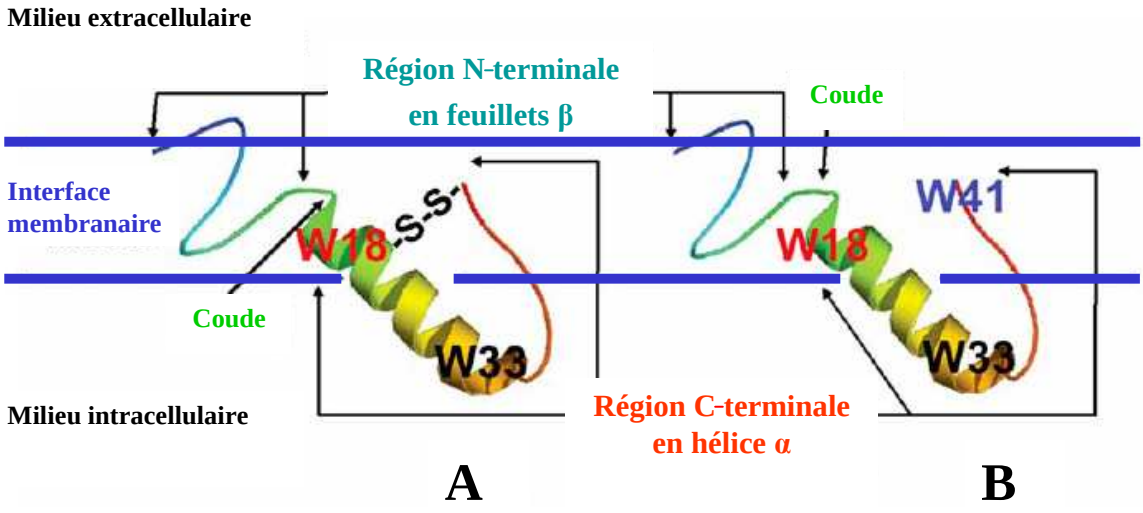


Figure I. 19. Schéma de la structure et l'orientation de deux bactériocines des sous-groupes 1/ 2 et 3 (*p.41*) **dans la membrane plasmique de la bactérie cible** d'après Nissen-Meyer J. et al. (Nissen-Meyer *et al.*, 2009).

A : Structure des bactériocines dont la région *C*-terminale est stabilisée par un second pont disulfure.
B : Structure des bactériocines dont la région *C*-terminale est stabilisée par la présence de deux résidus Trp (W18 et W41) localisés à l'interface membrane-eau.

La structure hélice-coude-hélice adoptée par la région *C*-terminale est stabilisée dans le cas de la coaguline, la divercine V41, la divergicine M35, l'entérocine A, la pédiocine PA-1, la plantaricine 423 et la sakacine G par un second pont disulfure formé entre un résidu cystéine présent dans l'hélice α et un autre situé à l'extrémité *C*-terminale (**Figure I. 17**). Cependant, la majorité des bactériocines de classe IIa ne possèdent pas de cystéine en région *C*-terminale. La stabilisation de ces bactériocines impliquerait alors un tryptophane en position 18, conservé chez la majorité des bactériocines, et un second proche de l'extrémité *C*-terminale en position 41, à l'exception des carnobactériocines B2 et BM1, de la curvacine A, et des entérocines P et SE-K4 (**Figure I. 17 et 18**). Dans tous les cas, le coude situé entre les régions *N*- et *C*-terminales introduit une certaine flexibilité. Des études de mutagenèse ont révélé que les deux résidus tryptophane se positionneraient à l'interface membrane-eau et seraient impliqués dans la stabilisation de la structure hélice-coude-hélice (Fimland *et al.*,

2002b) (**Figure I. 19**). D'autres études ont montré que la réduction du pont disulfure situé en région *N*-terminale perturbait la structure de la bactériocine. Ceci engendrerait une diminution de la thermostabilité de la bactériocine et la rendrait moins active à des températures élevées (Fimland *et al.*, 2000). Cependant, les carnobactériocines B2 et BM1, la curvacine A/ sakacine A et les entérocines P et SE-K4, ne renferment ni un couple de cystéines impliquées dans la formation du second pont disulfure ni de tryptophanes impliqués dans la stabilisation de la structure hélice-coude-hélice de la région *C*-terminale. La détermination de la structure tridimensionnelle de la curvacine A (Haugen *et al.*, 2005) (**Figure I. 18**) révèle que sa région *C*-terminale est structurée en deux hélices α de six et onze résidus reliées entre elles par un coude, ce qui compenserait l'absence de pont disulfure et de tryptophane dans sa région *C*-terminale (Haugen *et al.*, 2005).

IV.1.2. Biosynthèse et régulation

Le schéma commun d'organisation des systèmes génétiques impliqués dans la biosynthèse, le transport et la régulation de la biosynthèse des bactériocines de classe IIa est constitué de trois groupes de gènes. Un groupe impliqué dans la biosynthèse et l'immunité à la bactériocine renferme les gènes codant le précurseur de la bactériocine (*B*) et la protéine d'immunité (*I*). Un groupe impliqué dans l'export de la bactériocine renferme les gènes codant un transporteur ABC (*D*), une protéine accessoire (*E*) et parfois une protéine de fonction inconnue (*C*) (Nes *et al.*, 1996). Enfin, un dernier groupe impliqué dans la régulation de la production de la bactériocine renferme les gènes codant une protéine senseur histidine kinase (*K*) et une protéine effectrice régulatrice (*R*) ainsi qu'une phéromone (*S*) (Ennahar *et al.*, 2000) (**Figure I. 20**). Le système génétique est structuré en une seule unité de transcription comme pour la pédiocine PA-1, la coaguline et la plantaricine 423 ou en plusieurs unités de transcriptions, chacune correspondant à un groupe de gènes comme chez la carnobactériocine B2 (Ennahar *et al.*, 2000) (**Figure I. 20**).

Souvent porté par des plasmides conjugatifs, le système génétique peut être aussi présent sur le chromosome bactérien comme c'est le cas pour la divercine V41 (Métivier *et al.*, 1998), l'entérocine A (Aymerich *et al.*, 1996) et la sakacine P (Tichaczek *et al.*, 1994) (Hühne *et al.*, 1996). Chez *Carnobacterium piscicoli* LV17B, le déterminant génétique de la carnobactériocine BM1 est situé sur le chromosome, tandis que celui de la carnobactériocine

B2 est plasmidique. De plus, les gènes impliqués dans l'export et la régulation des deux bactériocines sont localisés sur un plasmide (Quadri *et al.*, 1997b).

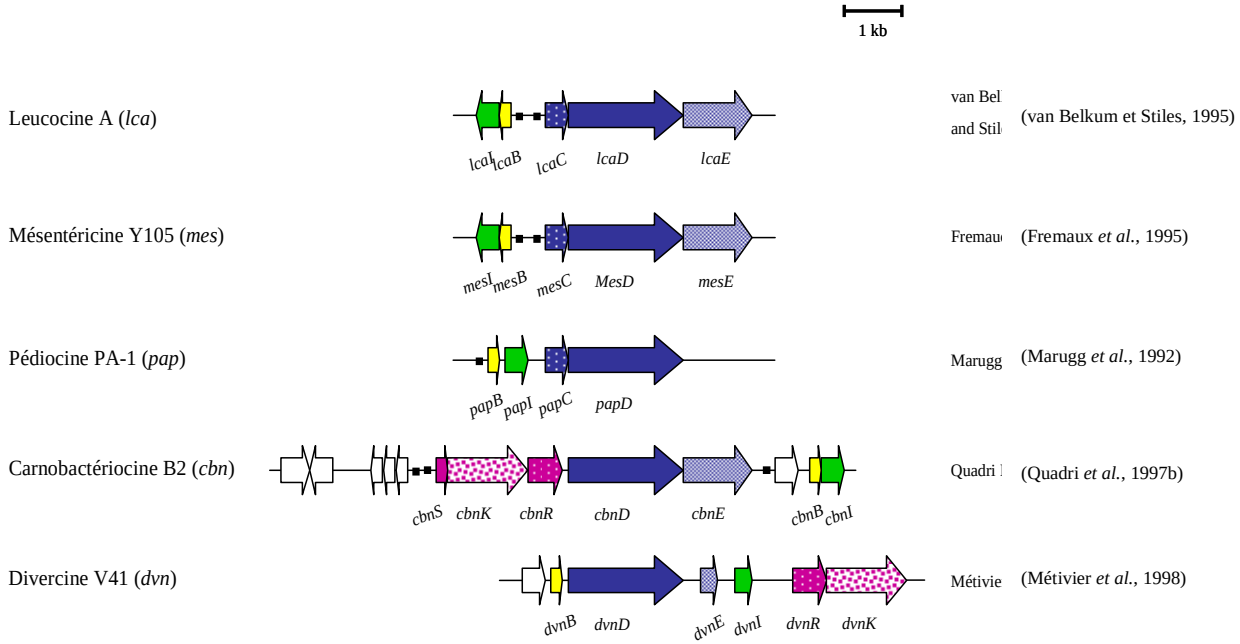
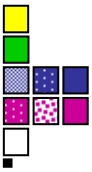


Figure I. 20. Organisation génétique des clusters de gènes impliqués dans la biosynthèse, le transport et la régulation de la biosynthèse des bactériocines de classe IIa d'après Ennahar S. et al. (Ennahar *et al.*, 2000).



: précurseur de la bactériocine.
: immunité.
: export.
: régulation.
: fonction inconnue.
: promoteur.

a. Biosynthèse

Les bactériocines de classe IIa sont synthétisées sous forme d'un précurseur, le plus souvent inactif, portant une séquence signal. La séquence signal portée par le précurseur détermine la voie de sécrétion de la bactériocine (**Figure I. 17**). Après sa biosynthèse, le précurseur de la bactériocine est exporté par le transporteur ABC. Ce transporteur ABC présente en région *N*-terminale une activité protéasique qui réalise le clivage du précurseur au niveau d'un motif Gly-Gly aboutissant ainsi à la forme active de la bactériocine (Håvarstein *et al.*, 1995) (**Figure I. 17 et 21**). Bien que l'export via un transporteur ABC soit le plus fréquemment rencontré chez les bactériocines de classe IIa, il existe des bactériocines de cette même classe telles que la bactériocine 31, l'entérocine P, l'entérocine SE-K4 (Eguchi *et al.*, 2001), l'hiracine JM79 et la listériocine 743A qui utilisent la voie générale Sec pour leur export vers le milieu extracellulaire (Cintas *et al.*, 1997, Kalmokoff *et al.*, 2001, Sánchez *et al.*, 2007, Tomita *et al.*, 1996).

b. Régulation

La régulation de la production des bactériocines de classe IIa répond au même mode de régulation (« quorum sensing ») que celui utilisé par les lantibiotiques (Eijsink *et al.*, 2002) (*p.33-34*). Le système de régulation est formé de trois composants : le peptide inducteur, ou phéromone, une protéine senseur histidine kinase transmembranaire (PHK) et une protéine effectrice régulatrice (PR) (Kleerebezem et Quadri, 2001) (**Figure I. 21**). La phéromone produite à faible concentration sous forme de précurseur est clivée pour acquérir sa forme active lors de son export via le transporteur ABC. Une fois dans le milieu extracellulaire, elle se fixe sur la PHK de la bactérie cible qui, activée, autophosphoryle un résidu histidine présent du côté cytosolique (Nes et Eijsink, 1999). La PHK activée, interagit alors avec la PR en transférant le phosphate de son résidu histidine sur un résidu aspartate. Une fois phosphorylée, la PR est activée et joue le rôle d'activateur transcriptionnel en stimulant les gènes impliqués dans la production de la bactériocine (Nes *et al.*, 1996, Nes et Eijsink, 1999) (**Figure I. 21**).

Dans certains cas, il semble que la régulation soit plus compliquée. Ainsi, un gène codant une PR tronquée a été retrouvé chez *Lb. sakei* LTH673 et chez *Lb. plantarum* NC8 (Straume *et al.*, 2007). Ceci pourrait suggérer la présence d'un système de répression utilisé par certaines bactéries pour inhiber leur production de bactériocine lorsque cette dernière se retrouve en forte concentration dans le milieu extracellulaire.

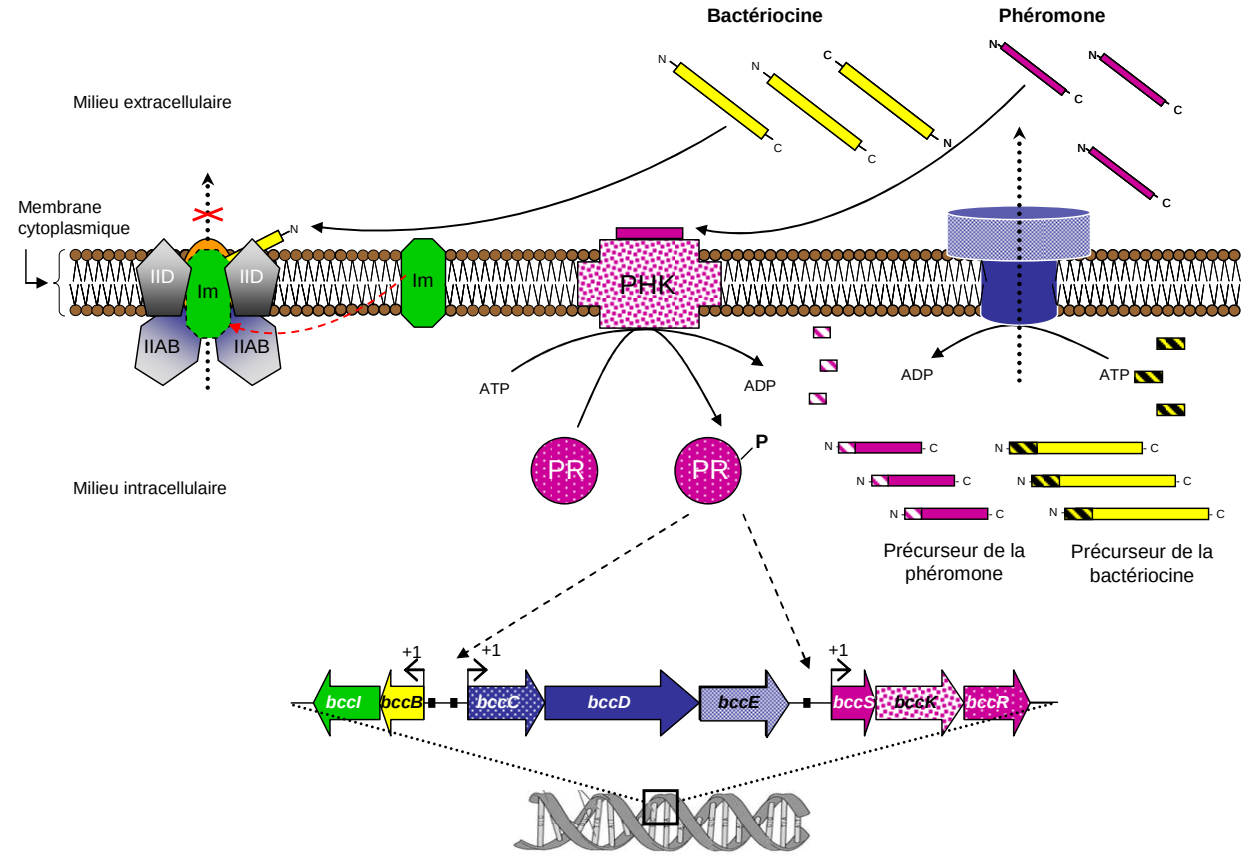


Figure I. 21. Schéma de la biosynthèse, la régulation de la biosynthèse et l'immunité des bactériocines de classe IIa.

: précurseur de la bactériocine/ bactériocine.
: immunité.
: export.
: régulation.
: IIAB, IIC, IID ; sous-unités de EII^{t}_{Man}.
: promoteur.

Im : protéine d'immunité.
PHK : protéine senseur histidine kinase.
PR : protéine effectrice régulatrice.
Bcc : système génétique impliqué dans la biosynthèse et la régulation de la biosynthèse d'une bactériocine de classe IIa.

IV.1.3. Mode d'action et immunité

a. Mode d'action

Les bactériocines de la classe IIa agissent sur les bactéries sensibles en perméabilisant la membrane cytoplasmique ce qui entraîne une dissipation de la force protomotrice et une perte de l'ATP cytoplasmique (Chikindas *et al.*, 1993, Herranz *et al.*, 2001a, Herranz *et al.*, 2001b). Le mécanisme exact de formation de ces pores demeure néanmoins mal connu (Diep *et al.*, 2007), mais il y aurait vraisemblablement une association de plusieurs molécules de bactériocines dans la bicouche membranaire (Ennahar *et al.*, 2000).

Des études utilisant des bactériocines modifiées ont montré que c'est la région *C*-terminale qui s'insère dans la membrane cytoplasmique. L'une de ces études consistait à produire une bactériocine chimère formée par la région *N*-terminale de la pédiocine AcH avec la région *C*-terminale de la protéine de sécretion du maltose (Maltose Binding Protein, MBP) (Miller *et al.*, 1998b). Produite chez *E. coli*, la pédiocine AcH fusionnée à la MBP emprunte la voie générale Sec pour être exportée et ne nécessite donc pas une co-expression de PapC et PapD, des protéines habituellement impliquées dans son export (Miller *et al.*, 1998a). Cette protéine chimère présente une activité antimicrobienne suggérant ainsi que la région *N*-terminale est impliquée dans la reconnaissance et le premier contact avec la membrane bactérienne cible (Chen *et al.*, 1997b, Fimland *et al.*, 2006, Kazazic *et al.*, 2002, Miller *et al.*, 1998b), alors que la région *C*-terminale est la région de la bactériocine qui pénètre la membrane aboutissant à la formation des pores.

Une autre étude a porté sur le rôle des tryptophanes conservés dans la séquence des bactériocines de classe IIa (**Figure I. 17**). Chez la sakacine P, la substitution des résidus Trp localisés en position 18 et 41 par des résidus aromatiques n'a pas d'effet sur l'activité antimicrobienne de la bactériocine, mais celle-ci devient inactive lorsque ces deux Trp sont remplacés par des résidus hydrophobes, non aromatiques, ou hydrophiles (Fimland *et al.*, 2002b). La substitution du Trp33 par des résidus hydrophobes n'a aucun effet sur l'activité antimicrobienne du peptide mais ceci n'est pas le cas lorsqu'il est substitué par des résidus aromatiques ou hydrophiles (Fimland *et al.*, 2002b). Ces résultats suggèrent que les Trp18 et Trp41 permettraient le positionnement de la bactériocine à l'interface membrane-eau et que le Trp33, se localiserait au niveau de la région qui pénètre dans la membrane plasmique (**Figure I. 18**) en apportant une stabilité à la structure tridimensionnelle du peptide lors de son contact avec la membrane de la bactérie cible. Ces études indiquent ainsi un modèle d'orientation des bactériocines de la classe IIa dans lequel la région *N*-terminale, cationique, portant la séquence consensus serait impliquée dans le premier contact avec les phospholipides de la membrane cytoplasmique. La région *C*-terminale plus hydrophobe, stabilisée par un second pont disulfure pour quelques bactériocines ou par l'interaction des résidus Trp18/Trp41, adopterait alors une forme hélice-coude-hélice. Le résidu Trp33 présent en fin d'hélice dans la région *C*-terminale induirait un coude et se trouverait « enfoui » à l'intérieur de la membrane cytoplasmique (Fimland *et al.*, 2002b, Nissen-Meyer *et al.*, 2009). De nombreuses études ont montré que la région *C*-terminale était impliquée dans la reconnaissance de la

cible et confère ainsi la spécificité de l'activité antimicrobienne à la bactérie productrice (Fimland *et al.*, 2000, Johnsen *et al.*, 2005b).

Des études ont montré que l'inactivation du gène *rpoN* codant la sous-unité σ^{54} de l'ARN polymérase chez *Li. monocytogenes* et *En. faecalis* conduisait à la résistance de ces deux bactéries à la mésentéricine Y105 (Dalet *et al.*, 2000, Robichon *et al.*, 1997). σ^{54} participe à l'expression de nombreux gènes codant des protéines impliquées dans des voies d'export et métaboliques (Merrick, 1993, Thöny et Hennecke, 1989). Par ailleurs, l'inactivation des gènes *rpoN*, *manR* et *mptA* codant respectivement σ^{54} et deux sous-unités de la mannose perméase phosphotransférase EII^{t}_{Man} (**Figure I. 22**) induit la résistance de *Li. monocytogenes* EGDe (Dalet *et al.*, 2001) et *En. faecalis* (Héchard *et al.*, 2001) à la mésentéricine Y105. Comme la mésentéricine Y105, d'autres bactériocines de classe IIa telles que la leucocine A (Ramnath *et al.*, 2000) ou la pédiocine AcH (Xue *et al.*, 2005) sollicitent EII^{t}_{Man} lors de leur interaction avec des bactéries cibles. EII^{t}_{Man} est une mannose perméase phosphotransférase impliquée dans le transport des sucres (glucose et mannose) chez les bactéries à Gram positif. Elle est formée de trois types de sous-unités dans lesquelles MptAB est une protéine localisée à la surface de la membrane cytoplasmique et MptC et MptD sont deux protéines transmembranaires (**Figure I. 22**) (Diep *et al.*, 2007, Héchard et Sahl, 2002).

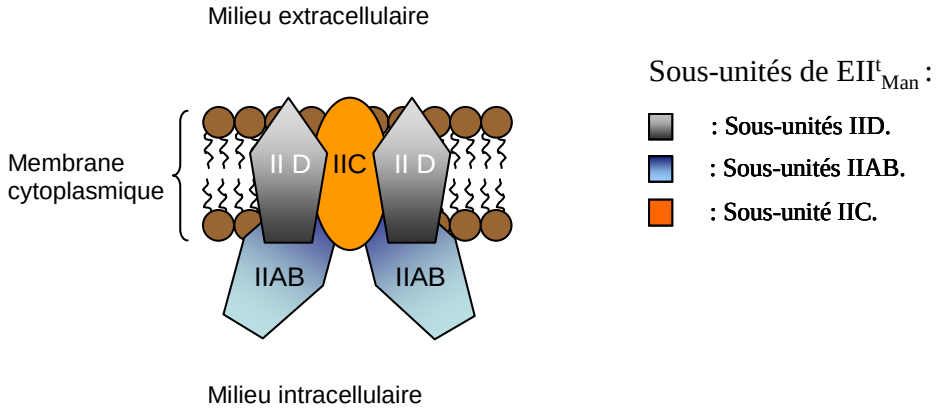


Figure I. 22. Structure de la mannose perméase du système phosphotransférase EII^{t}_{Man} chez les bactéries à Gram positif d'après Diep D.B. *et al.* (Diep *et al.*, 2007).

Les études menées par Karine Dalet et al. (Dalet *et al.*, 2001) ont indiqué que c'est la sous-unité MptD qui interagirait directement avec la mésentéricine Y105 du côté extracellulaire. Plus récemment, Dzung Diep et al. (Diep *et al.*, 2007) ont proposé un modèle d'interaction des bactériocines de classe IIa avec EII^{t}_{Man} (**Figure I. 23**).

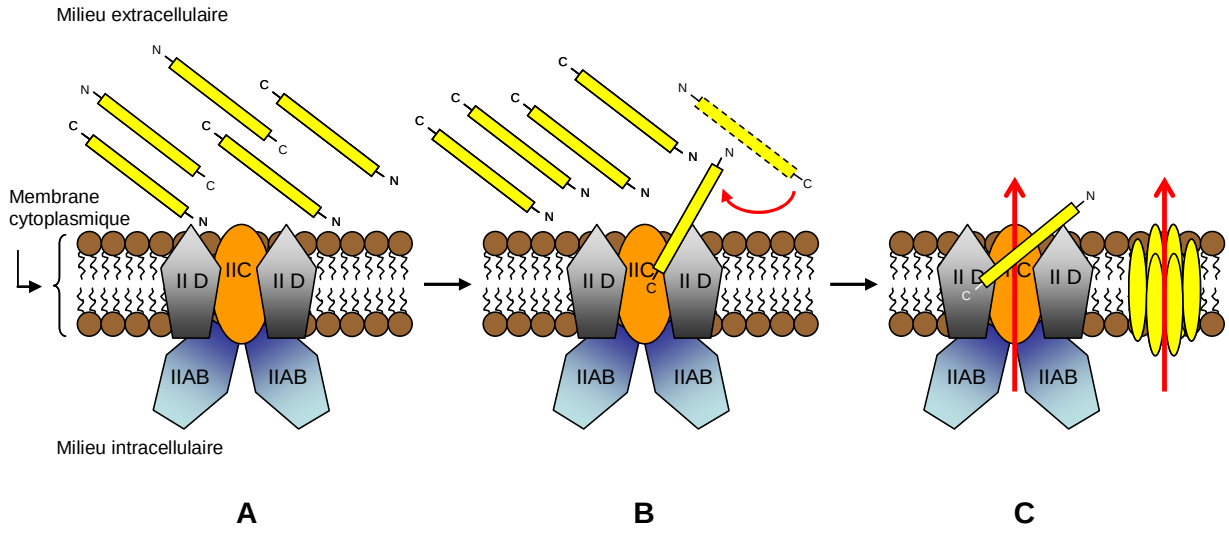


Figure I. 23. Mode d'action utilisé par les bactériocines de classe IIa et par les lactococcines A et B (classe IId) d'après Diep D.B. *et al.* (Diep *et al.*, 2007).

: Bactériocine.
: IIAB, IIC, IID ; sous-unités de EII^{t}_{Man}.

Ce modèle suggère que la bactériocine de classe IIa interagirait directement avec les deux sous-unités transmembranaires MptC et MptD lors du premier contact avec la membrane cytoplasmique de la bactérie cible (**Figure I. 23A et B**). L'interaction entre la bactériocine et MptC/MptD perturberait la conformation de EII^{t}_{Man}, provoquant alors la fuite d'organites intracellulaires et la mort de la bactérie cible (**Figure I. 23C**). Ceci indique que les bactériocines de classe IIa utiliseraient ce récepteur pour perméabiliser la membrane plasmique bactérienne. Cependant, les bactériocines de classe IIa seraient capables de former des pores à la surface de liposomes en absence de EII^{t}_{Man} (Chen *et al.*, 1997a, Chen *et al.*, 1997b). En effet, présentes en concentration suffisante dans le milieu extracellulaire, les monomères de batériocines s'assembleraient en oligomères et s'insèreraient dans la membrane de la bactérie cible pour former des pores (Ennahar *et al.*, 2000, Héchard et Sahl, 2002) (**Figure I. 23C**). Cependant, la nature exacte de ces pores est encore mal connue (Diep *et al.*, 2007).

b. Immunité

La majorité des bactéries productrices de bactériocines sont capable de produire des protéines d'immunité qui leur confèrent une protection contre leur propre toxine (Axelsson et Holck, 1995, Hühne *et al.*, 1996, Johnsen *et al.*, 2004). Les protéines d'immunité sont en général spécifiques à chaque souche productrice, mais peuvent aussi dans quelques cas

protéger la souche productrice contre des bactériocines phylogénétiquement proches vis-à-vis de sa propre bactériocine (Fimland *et al.*, 2002c, Johnsen *et al.*, 2004). Vingt protéines d'immunité de vingt bactériocines de classe IIa ont été caractérisées à ce jour (Fimland *et al.*, 2005). Les protéines d'immunité des bactériocines de classe IIa sont hydrophobes et sont formées de 88 à 115 acides aminés (**Figure I. 24**). Une classification en trois groupes principaux en fonction de leur séquence peptidique a été proposée (Drider *et al.*, 2006, Fimland *et al.*, 2002c, Martin-Visscher *et al.*, 2008a).

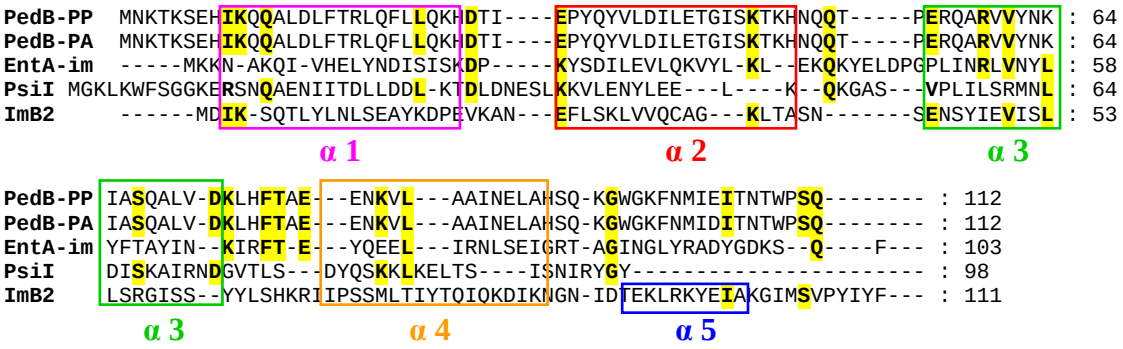
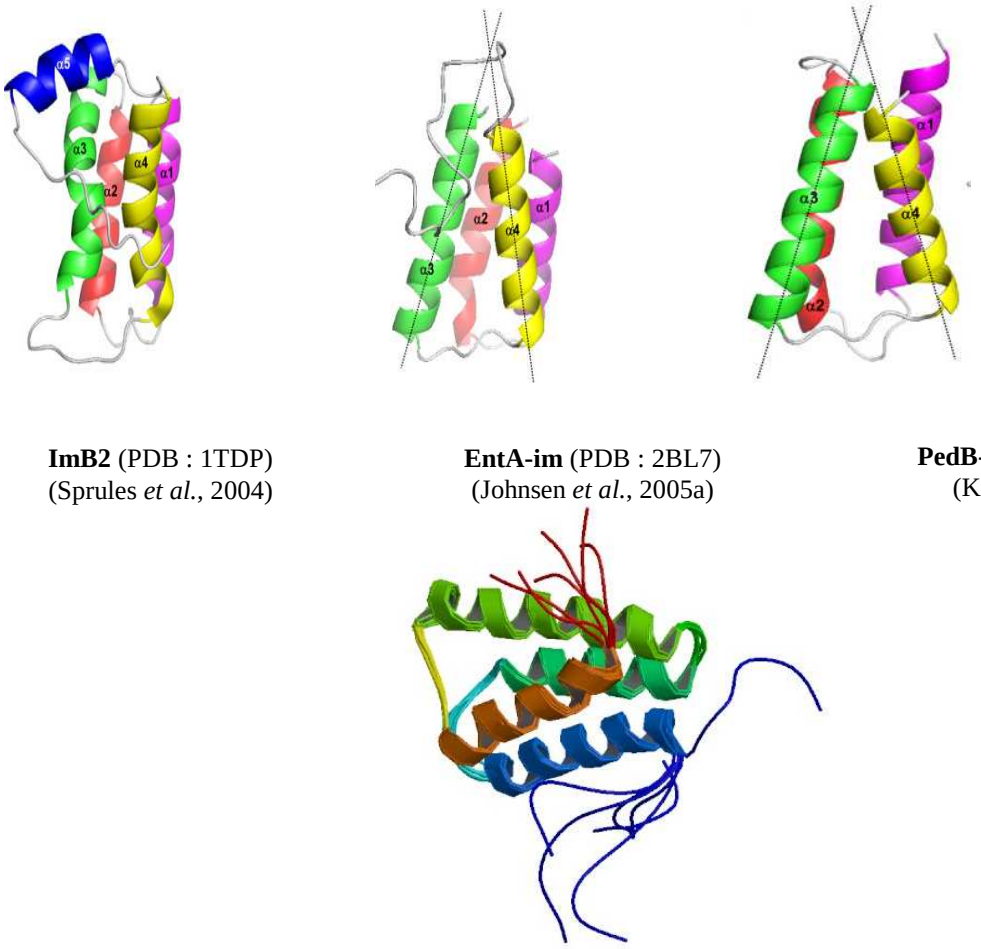


Figure I. 24. Alignement de séquences peptidiques de cinq protéines d'immunité de cinq bactériocines de classe IIa du group A (PedB-PA, PedB-PP et EntA-im), du goupe B (PsiI) et du groupe C (ImB2) (Kim *et al.*, 2007, Martin-Visscher *et al.*, 2008a).

PedB-PP : Protéine d'immunité de la pédiocine PP-1.
PedB-PA : Protéine d'immunité de la pédiocine PA-1.
EntA-im : Protéine d'immunité de l'entérocine A.
ImB2 : Protéine d'immunité de la carnobactériocine B2.
PsiI : Protéine d'immunité de la piscicoline 126.

Les structures tridimensionnelles déterminées par RMN des protéines d'immunité de la carnobactériocine B2 (imB2) (Sprules *et al.*, 2004), l'entérocine A (EntA-im) (Johnsen *et al.*, 2005a), de la pédiocine PA-1 (PedB-PA) et PP-1 (PedB-PP) (Kim *et al.*, 2007) et de la piscicoline 126 (PsiI) (Martin-Visscher *et al.*, 2008a) ont révélé une structure commune à ces trois protéines formée de quatre hélices α antiparallèles associées à une région *C*-terminale flexible (Johnsen *et al.*, 2005a, Kim *et al.*, 2007, Sprules *et al.*, 2004) (**Figure I. 25**). L'imB2 renferme une hélice α supplémentaire du côté de la région *C*-terminale. Contrairement aux autres protéines d'immunité, la protéine d'immunité de la piscicoline 126 (PsiI) présente une région *N*-terminale plus longue et flexible et une région *C*-terminale plus courte (Martin-Visscher *et al.*, 2008a) (**Figure I. 25**).



ImB2 (PDB : 1TDP)
(Sprules *et al.*, 2004)

EntA-im (PDB : 2BL7)
(Johnsen *et al.*, 2005a)

PedB-PP (PDB : 2IP36)
(Kim *et al.*, 2007)

PsiI (PDB : 2K19)
(Martin-Visscher *et al.*, 2008a)

Figure I. 25. Structures tridimensionnelles des protéines d'immunité de la carnobactériocine B2 (ImB2), de l'entérocine A (EntA-im), de la pédiocine PP-1 (PedB-PP) et de la piscicoline 126 (PsiI).

Les protéines d'immunité sont localisées dans le milieu intracellulaire et semblent ainsi exercer leur action du côté intracellulaire de la membrane plasmique. Bien qu'aucune étude n'ait réussi à prouver une interaction directe entre les bactériocines de classe IIa et leur protéine d'immunité (Sprules *et al.*, 2004), il a été montré que la région *C*-terminale des bactériocines interagirait probablement avec la région *C*-terminale des protéines d'immunité (Johnsen *et al.*, 2005b). Ceci serait vraisemblablement, dû à la flexibilité de la queue *C*-terminale des protéines d'immunité (Johnsen *et al.*, 2005b). Dzung Diep et al. suggèrent que la bactériocine et la protéine d'immunité interagiraient mais de façon indirecte, via la EII^{t}_{Man} (Diep *et al.*, 2007). Une fois la bactériocine fixée à EII^{t}_{Man}, la protéine d'immunité viendrait interagir avec le complexe EII^{t}_{Man}/bactériocine du côté intracellulaire (**Figure I. 26B**) en empêchant ainsi la fuite d'ions et d'organites intracellulaires (Diep *et al.*, 2007) (**Figure I. 26C**).

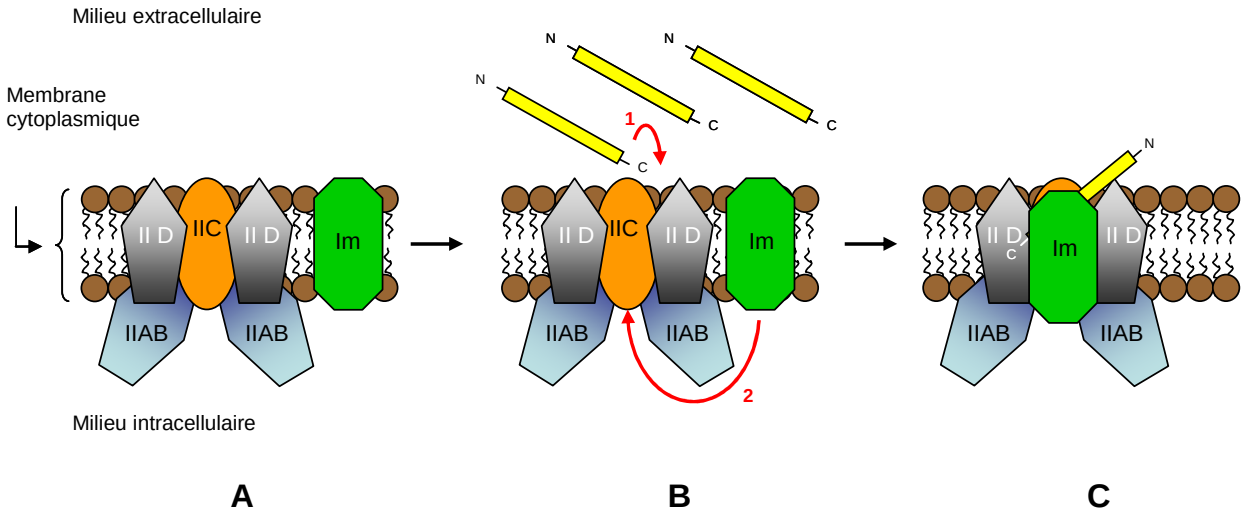


Figure I. 26. Modèle d'interaction de la protéine d'immunité avec la mannose perméase phosphotranférase EII^{t}_{Man} pour les bactériocines de classe IIa et certaines bactériocines de classe IId (lactococcines A et B) proposé par Diep D. B.*et al.* (Diep *et al.*, 2007)

: Bactériocine.
: Protéine d'immunité.
: IIAB, IIC, IID ; sous-unités de EII^{t}_{Man}.

IV.2. La classe IIb

Les bactériocines, communément appelées « two-peptides », sont formées de deux peptides différents, α et β, dont l'activité antimicrobienne optimale nécessite la présence des deux peptides complémentaires, le plus souvent en quantité équimolaire (Garneau *et al.*, 2002, Nissen-Meyer *et al.*, 2009, Oppegård *et al.*, 2007b). Dans certains cas, ces peptides peuvent être actifs individuellement comme c'est le cas de la lactacine F (Allison *et al.*, 1994) et des plantaricines EF et JK(Anderssen *et al.*, 1998).

Depuis l'identification de la lactococcine G chez *Lb. lactis* (Nissen-Meyer *et al.*, 1992), environ 15 bactériocines de la même classe ont été isolées et caractérisées (**Figure I. 27**). Ces bactériocines possèdent une taille très variable allant de 25 résidus (plantaricine J, PlnJ) à 62 résidus (thermophiline A, ThmA). Comme les autres bactériocines de classe II, les bactériocines de classe IIb possèdent un spectre d'activité incluant de nombreux genres de bactéries à Gram positif pathogènes telles que *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Staphylococcus* et *Streptococcus* ou commensales comme *Lactobacillus*, *Lactococcus* et

Pediococcus (Garneau *et al.*, 2002). Les systèmes génétiques impliqués dans la biosynthèse et la régulation des « two-peptides » sont organisés en clusters de gènes comportant de un à six opérons (Diep *et al.*, 2009, Nissen-Meyer *et al.*, 2010).

IV.2.1. Structure

Des études de dichroïsme circulaire et de RMN ont été réalisées sur trois bactériocines de classe IIb : la lactococcine G et les plantaricines EF et JK (Fimland *et al.*, 2008, Hauge *et al.*, 1998a, Hauge *et al.*, 1999, Rogne *et al.*, 2008, Rogne *et al.*, 2009). Ces bactériocines se sont révélées non structurées dans un environnement aqueux. En revanche, elles acquièrent des structures en hélice lors d'un contact avec un environnement plus hydrophobe, en présence de trifluoroéthanol (TFE) ou exposées à des structures mimant les membranes, telles que des micelles ou des liposomes (Fimland *et al.*, 2008, Hauge *et al.*, 1998a, Hauge *et al.*, 1999, Rogne *et al.*, 2008, Rogne *et al.*, 2009). A l'exception de la plantaricine S β et de la plantaricine NC8 β qui renferment respectivement des motifs AXXXA et SXXXS, les bactériocines de classe IIb présentent le motif conservé GXXXG impliqué dans les interactions inter-hélices transmembranaires (Senes *et al.*, 2000, Senes *et al.*, 2004).

La lactococcine G est la bactériocine la plus étudiée de cette classe (Hauge *et al.*, 1998a, Moll *et al.*, 1996, Moll *et al.*, 1998, Nissen-Meyer *et al.*, 1992, Oppegård *et al.*, 2007a, Oppegård *et al.*, 2008, Rogne *et al.*, 2008). Elle est formée d'un peptide α (LcnG α) de 39 acides aminés et d'un peptide β (LcnG β) de 35 acides aminés. La lactococcine G renferme deux motifs GXXXG chez LcnG α (Gly7-Gly11 et Gly18-Gly22) et un seul chez LcnG β (Gly18-Gly22). Les structures tridimensionnelles des deux peptides LcnG α et LcnG β constituant la lactococcine G ont été déterminées par RMN en présence de micelles de DPC ou dans le TFE (Rogne *et al.*, 2008) (**Figure I. 28**). En présence de micelles, LcnG α présente une région *N*-terminale (résidus 3 à 21) et une région *C*-terminale (résidus 24 à 34) structurées en hélices α avec une région intermédiaire (résidus 18 à 22) assez flexible. Comme pour LcnG α, les régions *N*- et *C*-terminales de LcnG β forment des hélices α en présence de TFE, mais une seule hélice est observée dans la région *N*-terminale en présence de micelles (Rogne *et al.*, 2008). De plus, les hélices α des régions *N*-terminales des deux peptides sont amphipathiques. La structure tridimensionnelle de la lactoccocine G suggère que LcnG α et LcnG β seraient orientées dans la même direction, générant des interactions inter-hélices transmembranaires via leurs motifs GXXXG, Gly7-Gly11 et Gly18-Gly22 (Oppegård *et al.*, 2008, Rogne *et al.*, 2008).

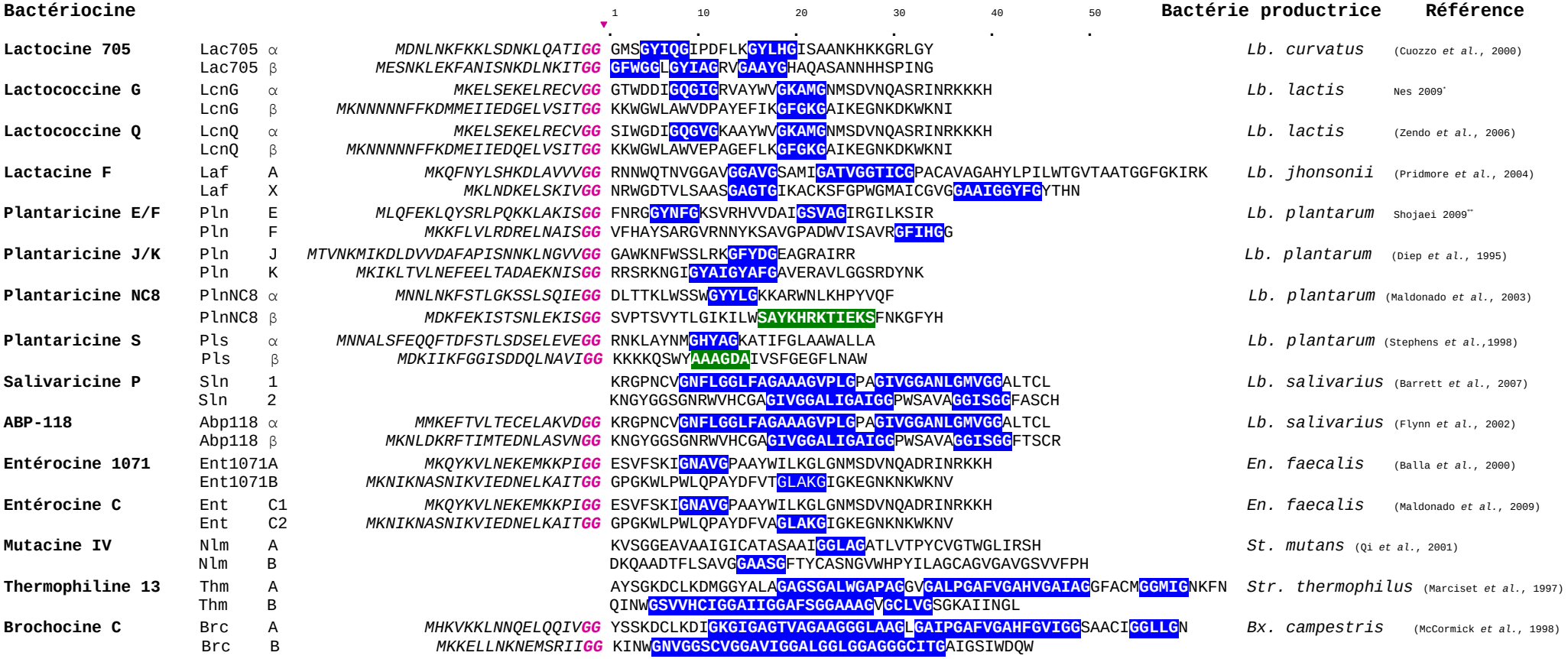


Figure I. 27. Séquences en acides aminés de bactériocines de classe IIb.

La séquence spécifique au précurseur de la bactériocine est représentée en italique, le site de clivage (motif GG) est représenté en violet. Le motif GXXXG caractéristique des bactériocines de classe IIb est surligné en bleu où X représente n'importe quel acide aminé. Les plantaricines S β et NC8 β possèdent respectivement un motif AXXXA et SXXXS au lieu de GXXXG ; ils sont surlignés en vert. Les bactériocines de classe IIb qui ont été partiellement séquencées n'ont pas été représentées ici : la leucocine H (Blom *et al.*, 1999), la lactococcine MN (van Belkum *et al.*, 1991a) et la lactococcine MMT24 (Ghrairi *et al.*, 2005). * : Les numéros accessoires (NCBI) des LcnG α et LcnG β sont ACR43769 et ACR43770 respectivement. ** : Les (numéros accessoires NCBI) des PlnE et PlnF sont ACY69229.1 et ACY69224.1 respectivement. (*Bx. : Brochothrix*).
▸ : Site de clivage.

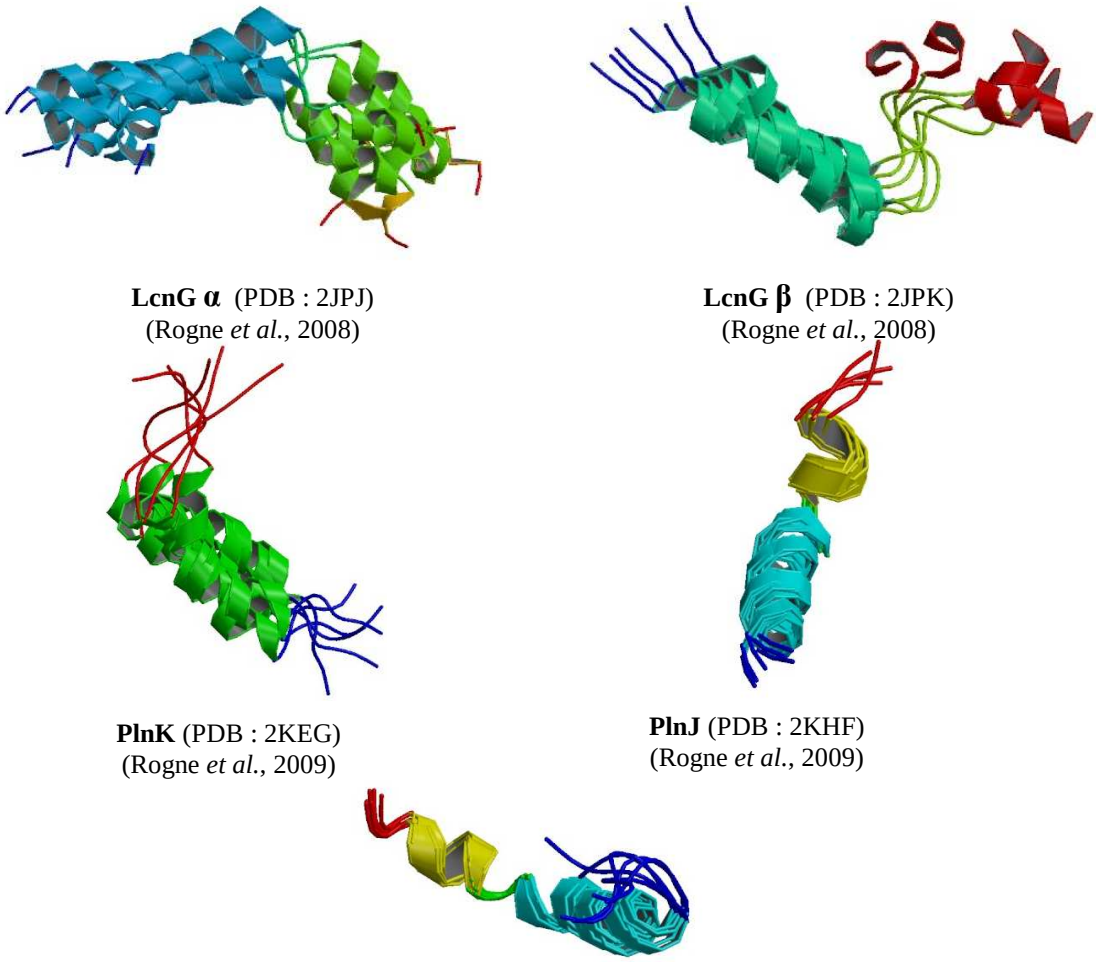


Figure I. 28. Structures tridimensionnelles de la lactococcine G et des plantaricines EF et JK en contact avec des micelles.

L'extrémité *N*-terminale riche en résidus Trp (Trp3, Trp5, Trp8) se situerait à l'interface membranaire du côté extracellulaire, alors que l'extrémité *C*-terminale fortement cationique (Arg35, Lys36, Lys37, Lys38, His39) se retrouverait en contact avec les phospholipides membranaires à l'interface entre la membrane cytoplasmique et le milieu intracellulaire (Oppegård *et al.*, 2008, Oppegård *et al.*, 2010b) (**Figure I. 29**).

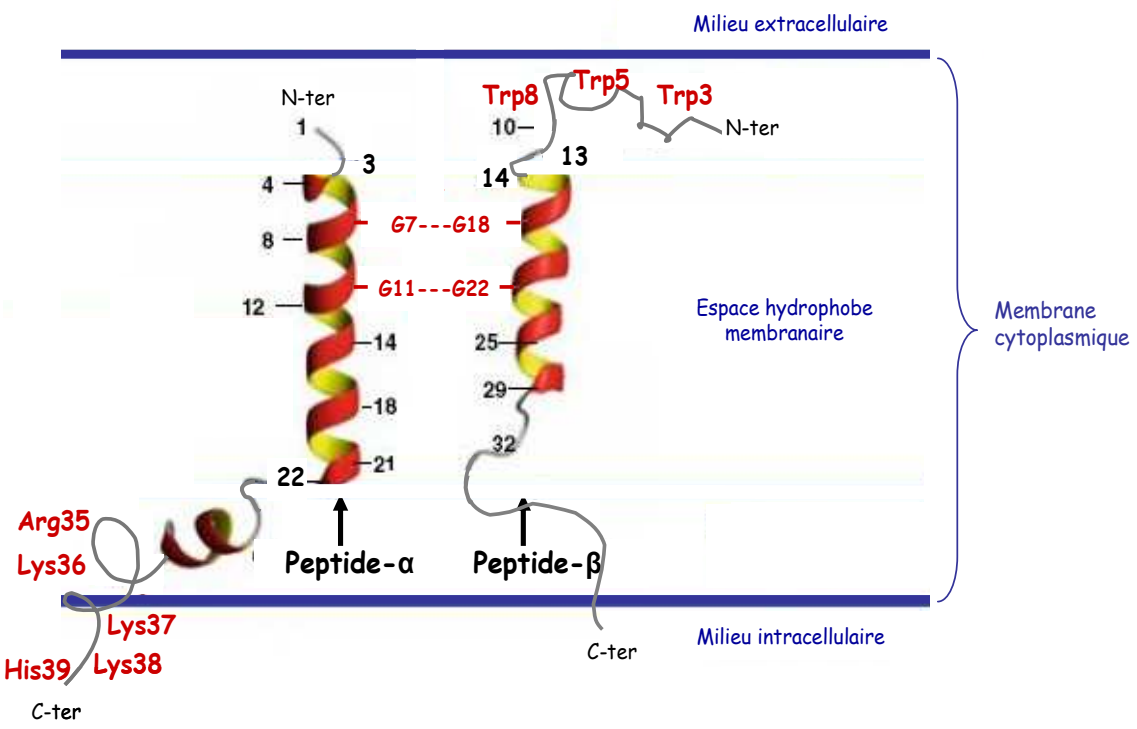


Figure I. 29. Modèle de la représentation structurale des deux peptides constituant la lactococcine G et de leur orientation dans la membrane des bactéries cibles d'après Oppegård C.*et al.* (Oppegård *et al.*, 2010b).

Les liaisons hydrogènes et les interactions de van der Walls entre les glycines (G7 et G18/ G11 et G22) sont représentés par des traits rouges en pointillés.

Présentant des similarités de séquences avec la lactococcine G, la lactococcine Q et l'entérocine 1071 pourraient partager la même structure tridimensionnelle.

Les structures tridimensionnelles de la plantaricine EF et de la plantaricin JK ont également été déterminées par RMN (Fimland *et al.*, 2008, Rogne *et al.*, 2009) (**Figure I. 28**). Les plantaricines EF et JK sont composées de 33 (PlnE), 34 (PlnF), 25 (PlnJ) et 32 résidus (PlnK) et renferment un (PlnF et PlnJ) ou deux (PlnE et PlnK) motifs GXXXG. Comme pour la lactococcine G, les plantaricines EF et JK sont structurées en hélice α. De plus, les peptides complémentaires PlnE et PlnF d'une part, PlnJ et PlnK d'autre part, semblent interagir au niveau de leurs motifs GXXXG via leurs structures en hélice (**Figure I. 28**) (Fimland *et al.*, 2008, Rogne *et al.*, 2009).

IV.2.2. Biosynthèse et régulation

Le système génétique impliqué dans la biosynthèse, le transport et la régulation de la biosynthèse des bactériocines de classe IIb est formé de un à six opérons. Un groupe de gènes impliqué dans la biosynthèse et l'immunité des deux peptides composant la bactériocine

renferme un gène codant une protéine d'immunité et deux gènes codant les deux peptides. Un même système génétique peut porter jusqu'à trois groupes de gènes impliqués dans la biosynthèse et l'immunité de trois bactériocines différentes. Un groupe impliqué dans le transport de la (ou des) bactériocine(s) renferme les gènes codant un transporteur ABC et une protéine accessoire (Diep *et al.*, 2009). Un groupe impliqué dans la régulation de la production de la bactériocine renferme les gènes codant une protéine senseur histidine kinase et deux protéines effectrices, l'une activatrice et l'autre inhibitrice, ainsi qu'une phéromone (Diep *et al.*, 2009) (**Figure I. 29**).

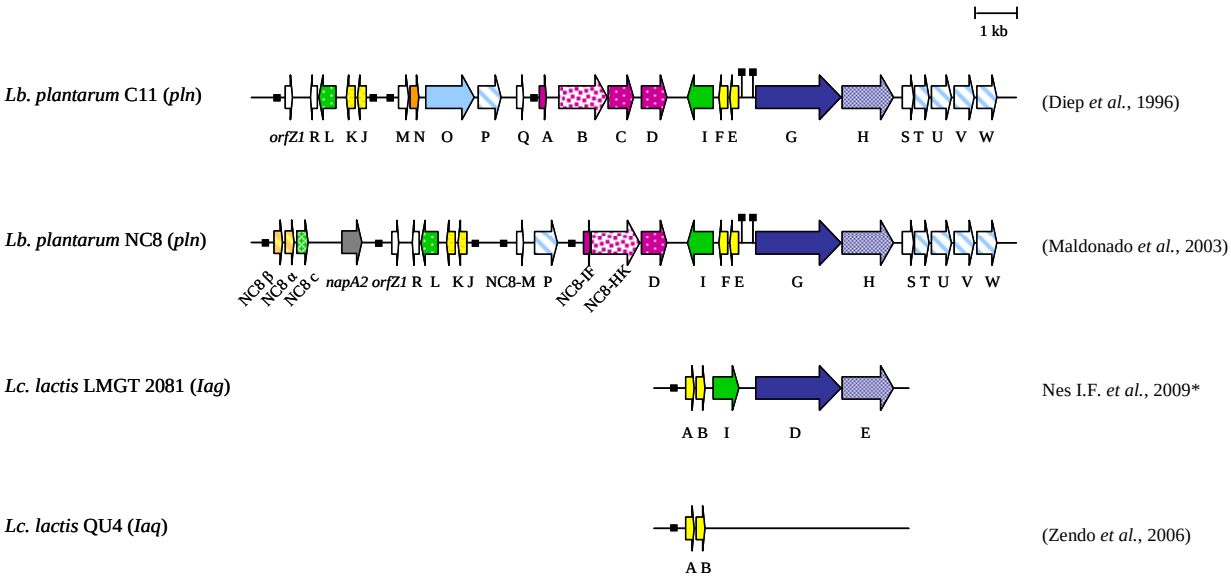


Figure I. 30. Organisation génétique des clusters de gènes impliqués dans la biosynthèse, le transport et la régulation des bactériocines de classe IIb produites par *Lb. plantarum* (NC11 et NC8) et *Lc. lactis* (LMGT 2081 et QUA) d'après Diep D. B.*et al.* (Diep *et al.*, 2009). (* Le numéro accessoire sur NCBI est ACR43770).

: précurseurs des bactériocines.
: export.
: immunité.
: régulation.
: protéinases de la famille des CAAX.
: protéine de la famille des glycosyl transférase de groupe 2.
: transporteur Na^+/ H^+.
: protéines de fonction inconnue.
: promoteur.

Lag : lactococcine G.
Laq : lactococcine Q.
Pln : plantaricine.

a. Biosynthèse

Les bactériocines de classe IIb sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs comportant un peptide leader de 15 à 30 acides aminés renfermant un motif Gly-Gly. La bactériocine acquiert sa forme active après hydrolyse du précurseur en aval des deux résidus glycine au cours de l'export via le transporteur ABC (Håvarstein *et al.*, 1994, Håvarstein *et al.*, 1995, Higgins, 1992, Kaletta et Entian, 1989).

Il existe, au moins, cinq gènes impliqués dans la biosynthèse et la régulation des bactériocines « two-peptides ». Les gènes codant les deux précurseurs sont toujours retrouvés à côté l'un de l'autre sur le même opéron, suivis du gène codant la protéine d'immunité (Nissen-Meyer ett Nes, 1997, Oppegård *et al.*, 2007b). Dans le cas de la biosynthèse de la lactococcine G, cet opéron porte les gènes codant les deux précurseurs (*lagA* et *lagB*) et le gène codant la protéine d'immunité (*lagC*), mais également les gènes impliqués dans le transport et la maturation des deux bactériocines, soit un gène codant le transporteur ABC (*lagD*) ainsi qu'un gène codant la protéine accessoire (*lagE*). Chez d'autres bactériocines, comme la plantaricine NC8, la plantaricine EF et la plantaricine JK, les gènes codant le transporteur ABC (*plnD*) et la protéine accessoire (*plnH*) sont localisés sur un second opéron à proximité de celui portant les gènes codant les deux précurseurs (*plnNC8 α*, *plnNC8 β*, *plnE*, *plnF*, *plnJ* et *plnK*) et la protéine d'immunité (*plnNC8c*, *plnI* et *plnL*) (Diep *et al.*, 2009, Nissen-Meyer *et al.*, 2010) (**Figure I. 30**).

b. Régulation

La production des bactériocines de classe IIb est soit constitutive soit inductible par une phéromone comme c'est le cas pour l'ABP-118 (Flynn *et al.*, 2002), la plantaricine NC8 (Maldonado *et al.*, 2004) et les plantaricine EF et JK (Diep *et al.*, 1995, Diep *et al.*, 1996). La régulation de la production des bactériocines de classe IIb répond au même mode de régulation (« quorum sensing ») que celui utilisé par les lantibiotiques et les bactériocines de classe IIa (Kleerebezem et Quadri, 2001) (*p.33-34*). La production d'un grand nombre de bactériocines de classe IIb est régulée au niveau transcriptionnel via un système de régulation à trois composants comportant un peptide phéromone, une protéine histidine kinase membranaire ainsi qu'une ou plusieurs protéines régulatrices (Diep *et al.*, 2009, Kleerebezem et Quadri, 2001)(**Figure I. 31**).

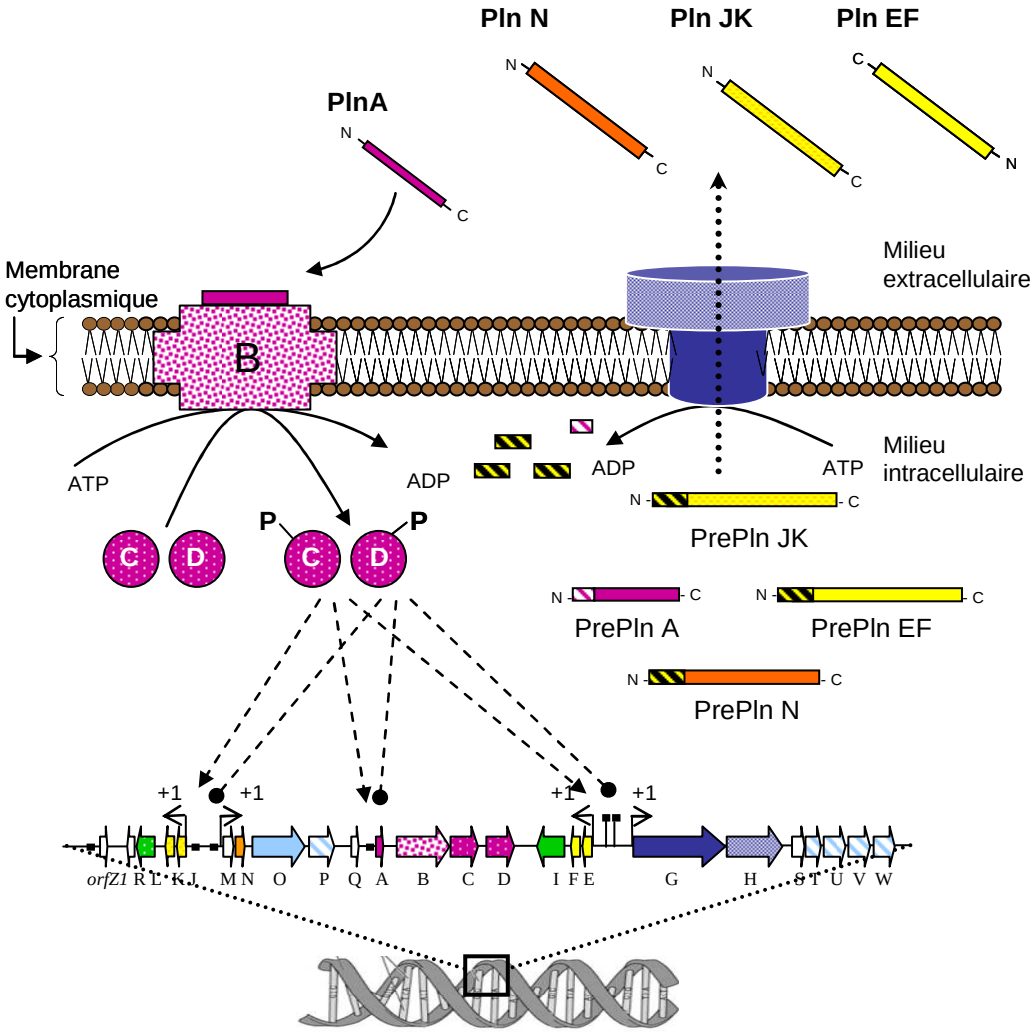


Figure I. 31. Schéma de la biosynthèse et la régulation de la production des bactériocines « two-peptides » chez *Lb. plantarum* C11.

: précurseur de la bactériocine/ bactériocine.
: protéine d'immunité.
: export.
: régulation.
: protéinases de la famille des CAAX.
: protéine de la famille des glycosyl transférase de groupe 2.
: protéines de fonction inconnue.
: promoteur.
: activation.
: inhibition.

Pln : plantaricine.
B : protéine senseur histidine kinase.
C : protéine effectrice régulatrice activatrice.
D : protéine effectrice inhibitrice.

Comme pour les bactériocines, le précurseur de la phéromone acquiert sa forme active au cours de son export via l'ABC transporteur après un clivage protéolytique en aval du motif Gly-Gly. Les phéromones sont de courts peptides cationiques (19 à 26 acides aminés) comprenant 3 à 5 résidus chargés positivement. Ils possèdent la propriété de former des structures en hélices α à différents degrés d'amphipathie (Kleerebezem et Quadri, 2001). Ces phéromones sont dépourvues d'activité antimicrobienne malgré leur forte similarité de

séquence avec les bactériocines, à l'exception du cas de la plantaricine A (Diep *et al.*, 1994, Nissen-Meyer *et al.*, 1993b). Ainsi, la plantaricine A, phéromone de 26 acides (**Figure I. 32**) aminés induit sa propre production et celle des plantaricines EF et JK (Diep *et al.*, 1995, Diep *et al.*, 2003, Hauge *et al.*, 1998b). Des analyses structurales de la plantaricine A par dichroïsme circulaire (Hauge *et al.*, 1998b) et par RMN (Kristiansen *et al.*, 2005) (**Figure I. 32**) ont révélé un nouveau mécanisme d'interaction membranaire ente les phéromones et la membrane cytoplasmique à l'origine de son activité phéromone (Kristiansen *et al.*, 2005).

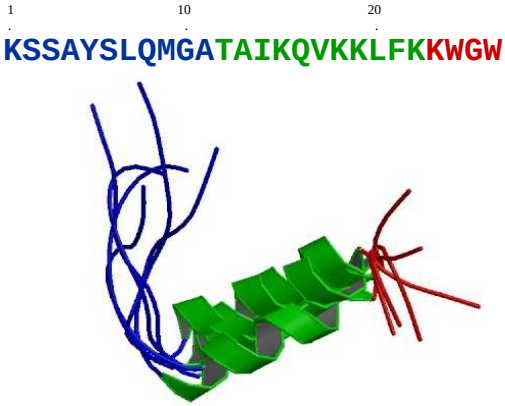


Figure I. 32. Séquence en acides aminés et structure tridimensionnelle de la plantaricine A (PDB : 1YTR) (Kristiansen *et al.*, 2005, Nissen-Meyer *et al.*, 1993b).

A l'aide de variants tronqués dans la région *N*-terminale, il a été montré que les deux formes énantiomères D (ne contenant que des acides aminés de configuration D) et L, présentent une activité antimicrobienne, mais que seule la forme L induit la production des plantaricines par *Lb. plantarum* C11. Ceci indique que l'activité phéromone dépend d'interactions stéréospécifiques entre la plantaricine A et son récepteur membranaire la PHK (Kristiansen *et al.*, 2005). Il a été alors suggéré que la plantaricine A interagirait d'abord d'une manière non chirale avec les lipides membranaires avant de se structurer en hélice α en partie *C*-terminale (résidus 12 à 21/23). L'hélice α amphipathique *C*-terminale s'orienterait ensuite parallèlement en pénétrant dans la membrane cytoplasmique par sa région hydrophobe, alors que sa région hydrophile se retrouverait à l'interface membrane-eau. La phéromone deviendrait alors suffisamment structurée pour permettre à sa région *N*-terminale d'interagir d'une façon chirale avec la PHK (Kristiansen *et al.*, 2005).

IV.2.3. Mécanisme d'action et immunité

a. Mécanisme d'action

Toutes les bactériocines de classe IIb dont le mécanisme d'action a été étudié, comme la lactacine F (Abee *et al.*, 1994), la lactocine 705 (Castellano *et al.*, 2003), la lactococcine G (Moll *et al.*, 1996, Moll *et al.*, 1998), la plantaricine EF (Moll *et al.*, 1999), la plantaricine JK (Moll *et al.*, 1999) et la thermophiline 13 (Marciset *et al.*, 1997) agissent en perméabilisant la membrane cytoplasmique de la bactérie cible, provoquant des mouvements d'influx et d'efflux d'ions et de petites molécules et conduisant à la mort de la bactérie. Les bactériocines de classe IIb sont actives à faible concentration contrairement à d'autres bactériocines. Des études ont montré que chaque bactériocine présentait des spécificités quant aux ions concernés (Oppegård *et al.*, 2007b). Ainsi, la lactococcine G perméabilise la membrane aux ions monovalents tels que Na^+, K^+, Li^+, Cs^+ et Rb^+ ainsi qu'à la choline mais pas à l'ion H^+ ni aux cations divalents tels que Mg^{2+} ou les ions phosphate (Moll *et al.*, 1996, Moll *et al.*, 1998). Les plantaricines EF et JK perméabilisent la membrane cytoplasmique aux mêmes molécules que la lactococcine G, mais contrairement à la lactococcine G, ces deux bactériocines présentent une spécificité pour l'ion H^+ (Moll *et al.*, 1999). La lactacine F, quant à elle provoque la fuite des ions K^+ et phosphate (Abee *et al.*, 1994). Cette capacité à différencier les ions passant à travers la membrane cytoplasmique serait due à la formation (ou à l'induction de la formation) de pores plus ou moins sophistiqués par ces bactériocines. Ces pores présenteraient une spécificité quant aux ions dont ils permettraient le passage à travers la membrane cytoplasmique. Par ailleurs, il a été montré que la thermophiline 13 produite par *Str. thermophilus* (**Figure I. 27**) induisait la dissipation et la perturbation de l'ensemble du potentiel électrique transmembranaire ainsi que du gradient de pH.

La structure formée par les interactions entre les deux hélices transmembranaires des deux partenaires de bactériocines « two-peptides », déterminée pour la lactococcine G (Oppegård *et al.*, 2010b) (**Figure I. 29**), pourrait être impliquée dans l'interaction avec un récepteur membranaire (Diep *et al.*, 2009, Nissen-Meyer *et al.*, 2010), comme c'est le cas de la lactococcine A et des bactériocines de classe IIa (Diep *et al.*, 2007, Haugen *et al.*, 2011). Un tel récepteur n'a cependant pas encore été identifié.

b. Immunité

Comme nous l'avons déjà vu précédemment, le gène codant la protéine d'immunité est toujours présent en aval des gènes codant les précurseurs des peptides α et β et confère la résistance aux deux peptides constituant la bactériocine.

Afin de mieux comprendre le mécanisme de reconnaissance de la protéine d'immunité par les bactériocines de classe IIb, des variants de la protéine d'immunité de la lactococcine G, Lag C ont été réalisés (Oppegård *et al.*, 2010a). La région *N*-terminale (résidus 1 à 13) de LcnG α et la région *C*-terminale de LcnG β (résidus 14 à 24) impliquées dans l'interaction entre les deux peptides (**Figure I. 29**) seraient indispensables à la reconnaissance de la lactococcine G par Lag C (Oppegård *et al.*, 2010a). Cela sous-entend que l'immunité chez les bactériocines de classe IIb implique une interaction entre la bactériocine et sa protéine d'immunité comme c'est le cas des bactériocines de classe IIa (*p.54*).

IV.3. La classe IIc : les bactériocines circulaires

Les bactériocines circulaires se différencient des autres bactériocines par la présence d'un cycle liant d'une façon covalente leurs extrémités *N*- et *C*-terminales via un mécanisme enzymatique encore mal connu à ce jour. La structure circulaire est responsable de la protection de ces bactériocines à l'égard de la protéolyse, en raison de l'absence de site de clivage aux exopeptidases (Maqueda *et al.*, 2008), et joue un rôle important dans l'augmentation de l'activité antimicrobienne due à une stabilité accrue de la molécule. Par ailleurs, le terme circulaire a été associé à ces bactériocines pour les distinguer des peptides cycliques comme les polymixines, la cyclosporine A et la gramicidine S synthétisées par la voie des peptide-synthétases appellées NRPS (nonribosomal peptides synthetase) (Koglin et Walsh, 2009, Marahiel et Essen, 2009). Comme les autres bactériocines, les bactériocines circulaires agissent par la perméabilisation de la membrane cytoplasmique et la perturbation de la force protomotrice membranaire de la bactérie cible aboutissant à la mort cellulaire.

Il existe des divergences quant à la classification de ces bactériocines circulaires. Paul Cotter *et al.* (Cotter *et al.*, 2005b) ont intégré ces bactériocines dans la classe II, alors que d'autres auteurs ont préféré créer une nouvelle classe pour ces bactériocines : la classe III (Franz *et al.*, 2007), la classe IV (Maqueda *et al.*, 2008) ou la classe V (Kemperman *et al.*, 2003). Huit bactériocines circulaires ont été caractérisées à ce jour, parmi lesquelles cinq sont produites par des bactéries lactiques (carnocycline A, gasséricine A/ reutéricine 6, entérocine AS-48, lactocycline Q, ubérolysine), tandis que la butyrivibriocine AR10 et la circularine A

sont produites respectivement par *Clostridium beijerinckii* (*Cl. beijerinckii*) et *Butyrivibrio fibrisolvens* (*By. fibrisolvens*) (**Figure I. 33**). Quant à la subtilosine A produite par *B. subtilis*, sa séquence est atypique. En effet, elle ne contient que 35 résidus contre 58 à 70 résidus pour les autres bactériocines circulaires et de plus, elle possède des ponts thioéthers distincts de ceux présents chez les lantibiotiques (Kawulka *et al.*, 2003).

La gasséricine A isolée de *Lactobacillus gasseri* (*Lb. gasseri*) et la reutéricine 6 isolée de *Lactobacillus reuteri* (*Lb. reuteri*) possèdent la même séquence en acides aminés (Kawai *et al.*, 2004) et aucun des deux peptides ne possède de D-alanine (Arakawa *et al.*, 2010). De plus, les clusters de gènes impliqués dans la biosynthèse de ces deux bactériocines circulaires sont identiques (Ito *et al.*, 2009). Ces deux peptides sont donc une seule et même bactériocine circulaire (Arakawa *et al.*, 2010). Très récemment, une nouvelle bactériocine circulaire nommée garvicine ML a été isolée de *Lc. garvieae*. La garvicine ML est un peptide de 60 résidus caractérisé par un très court peptide leader de 3 résidus (Borrero *et al.*, 2011).

Nous nous intéresserons ici plus particulièrement à l'entérocine AS-48, la bactériocine circulaire la mieux étudiée de nos jours, produite par différentes souches d'*En. faecalis* et *En. faecium* (Folli *et al.*, 2003, Joosten *et al.*, 1996, Maqueda *et al.*, 2004, Martinez-Bueno *et al.*, 1994, Tomita *et al.*, 1997).

IV.3.1. Structure

Les bactériocines circulaires ont été divisées en deux sous-groupes en fonction de leurs homologies de séquences en acides aminés (Cotter *et al.*, 2005b, Martin-Visscher *et al.*, 2009). Le groupe IIc (i) regroupe la carnocycline A, la circularine A, l'entérocine AS-48, la garvicine ML et l'ubérolysine, tandis que le groupe IIc (ii) comporte la butyrivibriocine AR10 et la gasséricine A/ reutéricine 6 (**Figure I. 33**).

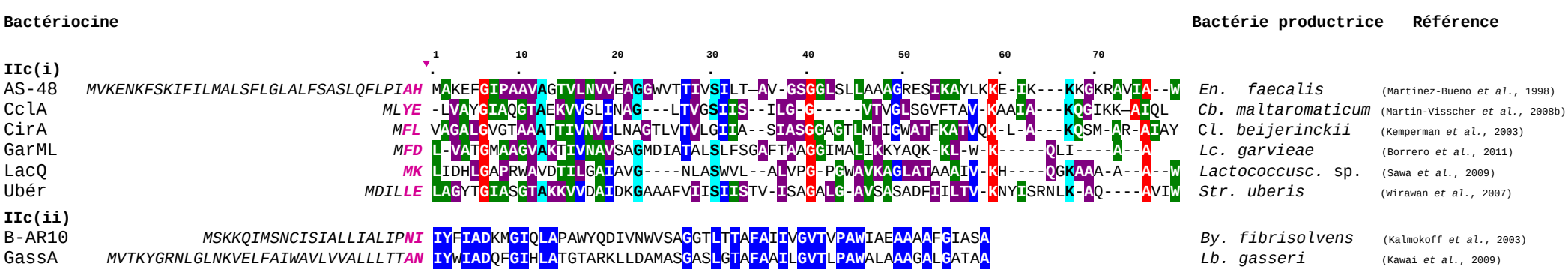


Figure I. 33. Alignement de séquences des bactériocines circulaires de classe IIc d'après Martin-Visscher L.A. *et al.* (Martin-Visscher *et al.*, 2009).

La séquence spécifique au précurseur de la bactériocine est représentée en italique, le site de clivage est représenté en violet. Dans chaque sous-groupe, sont surlignés en rouge, bleu clair, bleu foncé, vert et magenta les résidus conservés respectivement à 100 %, 83 %, 66 %, 50 % et 33 %. (AS-48 : entérocine AS-48 ; B-AR10 : butyrivibriocine-AR10 ; CclA : carnocycline A ; Cir : circularine ; Gar : garvicine ; Gass : gasséricine ; Lac : lactocyclicine ; Ubér : ubérolysine ; *Canobacterium maltaromatocum* : *Cb. maltamoraticum*).
▸ : Site de clivage.

L'entérocine AS-48 est une bactériocine circulaire cationique amphipathique composée de 77 acides aminés (Gálvez *et al.*, 1989). Des analyses par RMN (González *et al.*, 2000) et diffraction des rayons X (Sánchez-Barrena *et al.*, 2003) ont révélé sa structure est constituée de cinq hélices α : résidus 9-21 (α1), 25-34 (α2), 37-45 (α3), 51-62 (α4) et 64-5 (α5) (**Figure I. 34**) (González *et al.*, 2000, Langdon *et al.*, 1998) formant une structure tridimensionnelle compacte et globulaire (González *et al.*, 2000) (**Figure I. 34**).

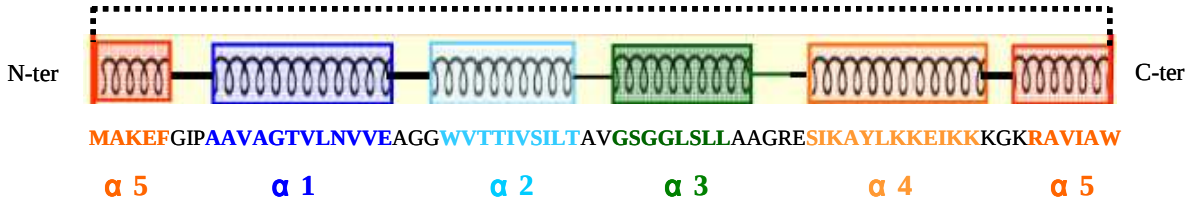
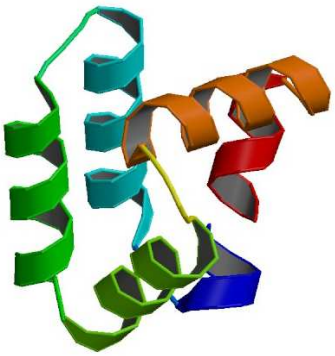


Figure I. 34. Structure secondaire de l'entérocine AS-48 (González *et al.*, 2000, Langdon *et al.*, 1998).

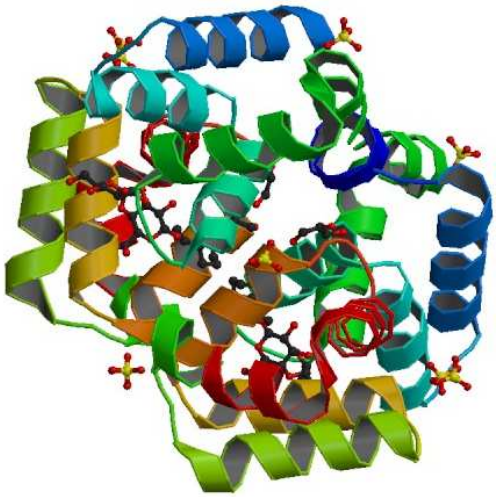
Le trait en pointillés représente la liaison peptidique formée entre la méthionine (M) *N*-terminale et le tryptophane (W) *C*-terminal au cours de la cyclisation.

Bien que la carnocycline A ne présente que 30 % d'identité de séquence avec l'entérocine AS-48, la structure tridimensionnelle de ces deux bactériocines est proche (**Figure I. 35**). Cependant, la carnocycline A ne possède que 4 régions en hélice α.

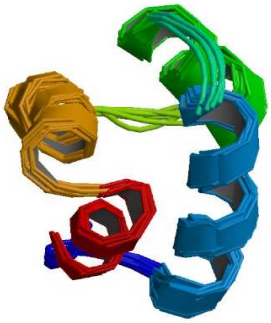
La structure circulaire ainsi que l'oligomérisation confèrent à ces bactériocines une activité biologique décuplée en apportant une stabilité thermodynamique et une intégrité à leur structure protéique ainsi qu'une protection contre des protéases (Maqueda *et al.*, 2008).



Monomère d'AS-48 (PDB : 1O83)
(Sánchez-Barrena *et al.*, 2003)



Dimère FD-II d'AS-48 (PDB : 1O84)
(Sánchez-Barrena *et al.*, 2003)



Carnocycline A (PDB : 2KJF)
(Martin-Visscher *et al.*, 2009)

Figure I. 35. Structures tridimensionnelles de la carnocycline A (Martin-Visscher *et al.*, 2009)) **et des formes monomérique et dimérique (FD-II) de l'entérocine AS-48** (Sánchez-Barrena *et al.*, 2003).

IV.3.2. Biosynthèse

Les gènes impliqués dans la biosynthèse des bactériocines circulaires sont organisés en clusters de gènes retrouvés sur le chromosome (butyrivibriocine AR10, circularine A, subtilosine, ubérolysine) ou sur un plasmide conjugatif (entérocine AS-48, gasséricine A). Le système génétique impliqué dans la biosynthèse et la régulation de la production de l'entérocine AS-48 renferme 10 gènes (Diaz *et al.*, 2003, Martinez-Bueno *et al.*, 1998) (**Figure I. 36**).

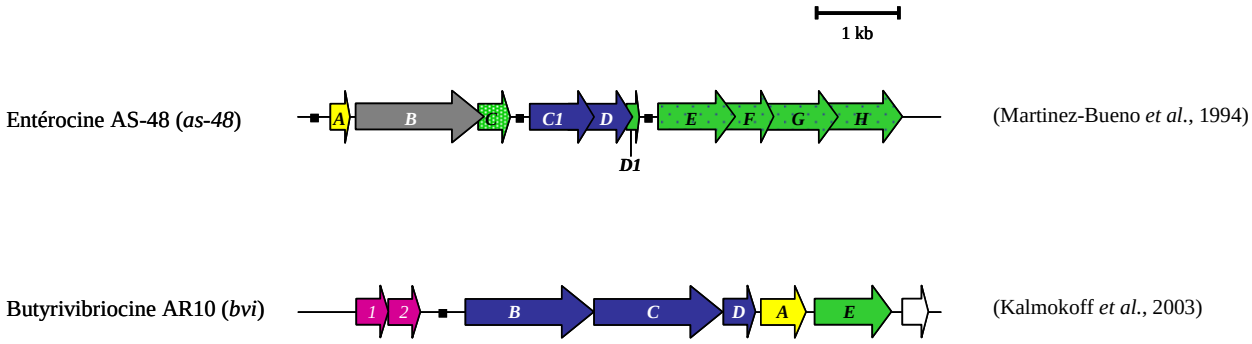


Figure I. 36. Organisation génétique des clusters de gènes impliqués dans la biosynthèse et la régulation de la production de deux bactériocines circulaires : l'entérocine AS-48 (*as-48*) (Martinez-Bueno *et al.*, 1998) **et la butyrivibriocine AR10 (*bvi*)** (Kalmokoff *et al.*, 2003).

: précurseur de la bactériocine.
: export.
: immunité.
: régulation
: protéine biosynthétique.
: protéines de fonction inconnue.
: promoteur.

Le gène *as-48A* code un précurseur de 105 résidus comprenant un peptide leader de 35 résidus sans motif Gly-Gly. Le gène *as-48D*$_1$ code une protéine d'immunité responsable de la protection de la souche productrice contre sa propre bactériocine. Les gènes *as-48C*$_1$*D* et *as-48EFGH* codent chacun un transporteur ABC impliqué respectivement dans l'export de la bactériocine et dans l'immunité de la souche productrice. Le transporteur ABC codé par le gène *as-48EFGH* joue le rôle de pompe d'efflux pour les molécules d'entérocine AS-48 présentes dans le milieu intracellulaire de la bactérie productrice (Diaz *et al.*, 2003). Ce système de protection vient compléter l'immunité apportée par la protéine d'immunité codée par le gène *as-48D*$_1$ (Diaz *et al.*, 2003). Se rajoute à ce système d'immunité, une protéine d'immunité auxilliaire codée par le gène *as-48C* dont le mécanisme d'action est encore mal connu (Fernández *et al.*, 2008). Enfin, le gène *as-48B* serait impliqué dans la maturation de la bactériocine (Martinez-Bueno *et al.*, 1998) (**Figure I. 36**). Produite sous forme d'un précurseur inactif, l'entérocine AS-48 subit une série de modifications durant son export avant d'acquérir sa forme active. En effet, le précurseur est d'abord clivé entre l'histidine (H^{-1}) et la méthionine (M^{+1}) par une peptidase spécifique avant de subir une cyclisation entre la méthionine (M) *N*-terminale et le tryptophane (W) *C*-terminal pour conduire à la forme active du peptide (Maqueda *et al.*, 2008, Martinez-Bueno *et al.*, 1994) (**Figure I. 37**).

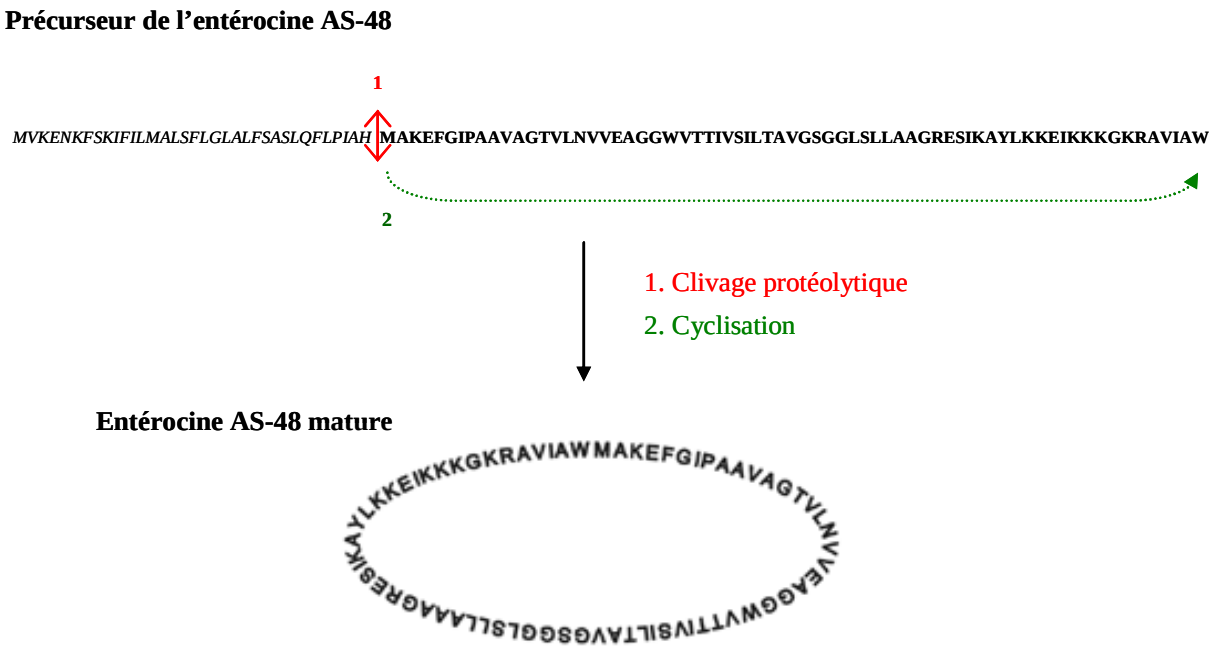


Figure I. 37. Voie de maturation de l'entérocine AS-48 (Maqueda *et al.*, 2008).

Le cluster de gènes de la butyrivibriocine AR10 comporte principalement 6 gènes, mais seul le gène *bviA* codant le précurseur de la bactériocine a été clairement identifié. Les gènes *bviB* et *bviE* coderaient respectivement un ABC transporteur et la protéine d'immunité. Précédant ce cluster, deux phases ouvertes de lecture (ORF1/ ORF2) codant un régulateur à deux composants, pourraient intervenir dans la régulation de la synthèse de la butyrivibriocine AR10 (Kalmokoff *et al.*, 2003) (**Figure I. 36**).

IV.3.3. Mécanisme d'action et immunité

a. Mécanisme d'action

Les bactériocines circulaires présentent un large spectre d'activité dirigé contre de nombreuses bactéries à Gram positif. L'activité contre des bactéries à Gram négatif n'interviendrait que lorsque la structure de leur membrane externe est altérée (Ananou *et al.*, 2005, Shelburne *et al.*, 2007) ou dans des conditions particulières (EDTA, sodium tripolyphosphate (STPP), pH 5, pH 8,6, chaleur) (Ananou *et al.*, 2005, Martin-Visscher *et al.*, 2011). Un modèle de mode d'action a été proposé pour l'entérocine AS-48 (Maqueda *et al.*, 2004, Sánchez-Barrena *et al.*, 2003).

L'entérocine AS-48 agirait sous forme d'homodimère en perméabilisant les membranes cytoplasmiques des bactéries cibles par la formation des pores. Au cours de son interaction

avec la membrane cytoplasmique de la bactérie cible, l'entérocine AS-48 prendrait deux formes homodimériques différentes, la FD-I (forme dimérique-I) et la FD-II. Les deux monomères de l'entérocine AS-48 FD-I et FD-II seraient respectivement liés par des interactions hydrophobes via les hélices α1, α2 et α3 et par des interactions hydrophiles via les hélices α4 et α5 (Sánchez-Barrena *et al.*, 2003) (**Figure I. 38**).

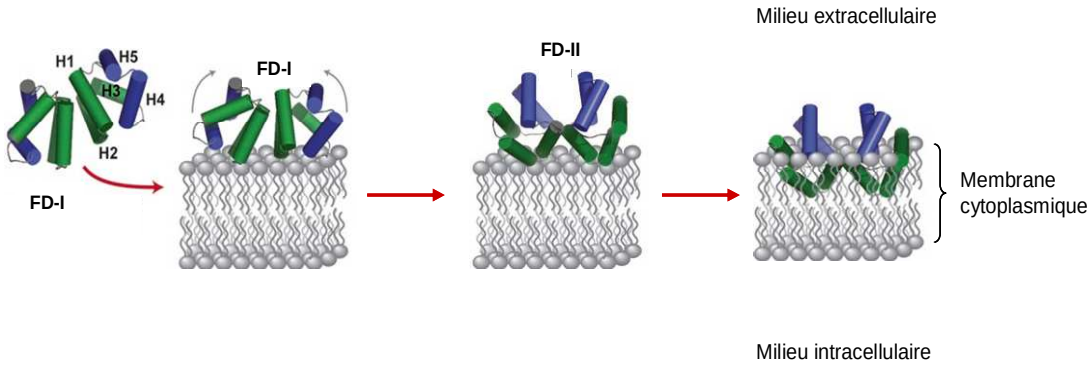


Figure I. 38. Représentation schématique du mode d'action de l'entérocine AS-48 d'après Sánchez-Barrena M. J. *et al.* (Sánchez-Barrena *et al.*, 2003).

Les hélices (H) **hydrophobes** et **hydrophiles** sont respectivement représentées en vert et en bleu. Les flèches grises indiquent le mouvement de rotation des deux monomères de l'entérocine AS-48 ; FD : forme dimérique.

Par sa forte charge cationique, localisée en particulier au niveau des hélices α4 et α5 (**Figure I. 34**), la FD-I de l'entérocine AS-48 interagirait fortement avec la membrane plasmique chargée négativement (Maqueda *et al.*, 2004) (**Figure I. 38**). Les dimères de bactériocines ayant interagi avec la membrane se réorganiseraient ensuite pour former la FD-II afin de faciliter l'insertion dans la membrane et la formation des pores (Sánchez-Barrena *et al.*, 2003) (**Figure I. 38**).

b. Mécanisme d'immunité

L'association de la protéine d'immunité à un système de transport ABC, jouant le rôle de pompe d'efflux, décuple la fonction d'immunité chez certaines souches productrices de bactériocines circulaires (Maqueda *et al.*, 2008).

Chez l'entérocine AS-48, la protéine d'immunité, codée par le gène *as-48D*$_1$, est une protéine de masse moléculaire de 6,3 kDa cationique et fortement hydrophobe, suggérant être une protéine totalement membranaire (Maqueda *et al.*, 2008). Des études ont montré que le gène *as-48EFGH* codait des protéines constituant un transporteur ABC impliqué dans la protection de souche productrice contre sa propre bactériocine en maintenant une faible

concentration de la bactériocine dans le milieu intracellulaire (Diaz *et al.*, 2003). D'autres études ont montré que le gène *as-48C* présent sur l'unité de transcription *as-48ABC* qui porte le gène codant le précurseur de l'entérocine AS-48, code une protéine d'immunité auxiliaire (**Figure I. 36**). En effet, les gènes codant la bactériocine et sa protéine d'immunité doivent être co-transcrits pour que l'immunité soit instantanée et effective dès la production de la bactériocine. Comme le gène *as-48D*$_1$ codant la protéine d'immunité n'est pas situé juste à coté de celui codant le précurseur d'AS-48, la protéine codée par le gène *as-48C* assurerait une première protection en attendant la transcription des gènes *as-48D*$_1$ et *as-48EFGH* présents sur des opérons différents (Fernández *et al.*, 2008).

IV.4. La classe IId : les bactériocines linéaires, non modifiées, non « pediocin-like »

La classe IId regroupe des bactériocines produites par différentes bactéries lactiques ainsi que des *Enterococcus*. La classe IId forme un groupe hétérogène de bactériocines qui ne présentent pas de similarités avec les autres bactériocines de classe II (Cotter *et al.*, 2005b) et n'ont pas de caractéristiques communes.

IV.4.1. Les différentes bactériocines de classe IId

La diversité de caractéristiques de séquences et de modes d'export des bactériocines de classe IId permet leur division en trois sous-groupes :

a- Bactériocines sécrétées via la voie de sécrétion Sec.

b- Bactériocines dépourvues de peptide leader et de séquence signal.

c- Autres bactériocines.

a. Bactériocines sécrétées via le système Sec

Le système Sec est la voie d'export la plus empruntée chez les archées, les eubactéries et les eucaryotes. Ce système d'export permet la translocation des précurseurs portant une séquence signal *N*-terminale vers le milieu extracellulaire. Au cours de l'export, le précurseur est clivé pour acquérir sa forme mature.

Parmi ces bactériocines, la divergicine A, produite par *Carnobacterium divergens* LV13, est la première bactériocine découverte produite par une bactérie lactique n'utilisant pas le transporteur ABC pour son export (Worobo *et al.*, 1995). La propionicine T1 est produite par deux souches bactériennes différentes de *Propionibacterium thoenii* sous forme de précurseur contenant une séquence signal Sec (Faye *et al.*, 2000). Comme la divergicine A et la propionicine T1, la lactococcine 972 est produite par *Lc. lactis* IPLA972 sous forme d'un précurseur renfermant une séquence signal Sec (Martínez *et al.*, 1999). D'autre part, la lactococcine 972 présente une forme active homodimérique, ce qui pourrait jouer un rôle important dans son mode d'action (*p.80*) (Martínez *et al.*, 2000, Martínez *et al.*, 2007, Martínez *et al.*, 2008) (**Figure I. 39**).

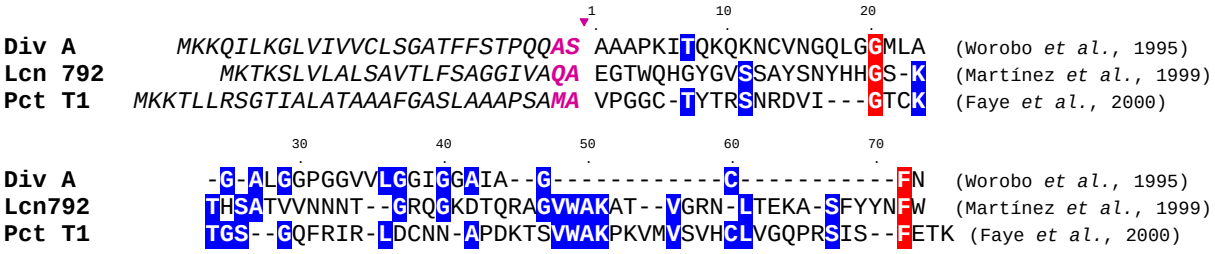


Figure I. 39. Alignement de séquences peptidiques des bactériocines de classe IId sécrétées via la voie Sec.

La séquence peptidique spécifique au précurseur est représentée en italique, le site de clivage est représenté en violet. Sont surlignés en rouge et en bleu les résidus conservés respectivement à 100 % et 65 %. (Div : divergicine ; Lcn : lactococcine ; Pct : propionicine).

Cependant, certaines bactériocines de classe IIa, comme les bactériocines T8/ 743A (De Kwaadsteniet *et al.*, 2006) et l'hilaricine JM 79 (Sánchez *et al.*, 2008), utilisent aussi la voie Sec pour leur export. En raison de la présence de la séquence consensus YGNGV/L et de la forte activité anti-*Listeria*, ces bactériocines ne sont pas placées dans la classe IId mais dans la classe IIa.

b. Bactériocines dépourvues de peptide leader et de séquence signal (« leaderless »)

- Bactériocines produites par des bactéries du genre *Enterococcus*

Les bactériocines « leaderless » peuvent être produite seules (auréocine 53, entérocine Q, lacticine Q, lacticine Z), ou bien sous forme de deux (entérocine I/J, entérocine L50, entérocine MR10) ou quatre peptides proches (Auréocine A70) (**Figure I. 40**).

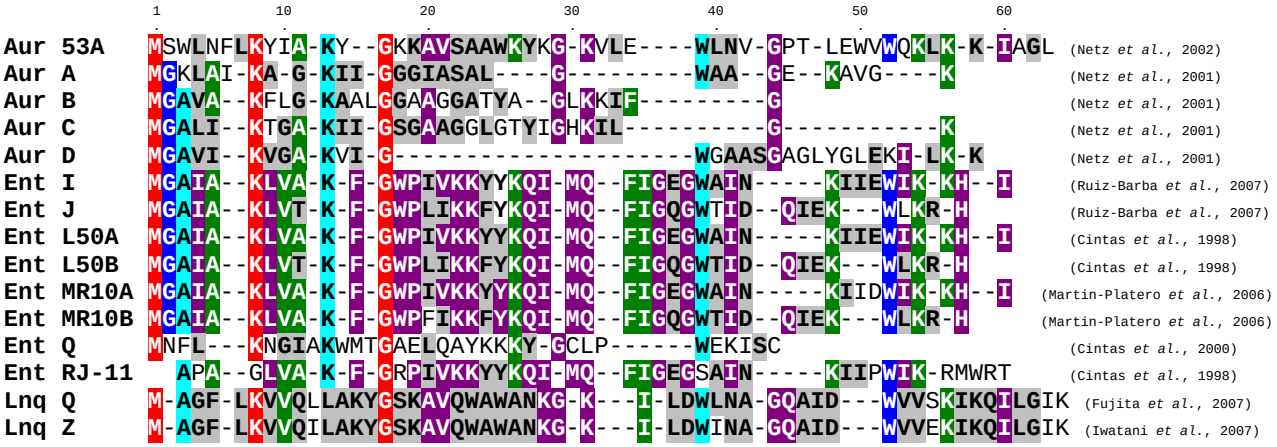


Figure I. 40. Alignement de séquences peptidiques des bactériocines de classe IId dépourvues de peptide leader et de séquence signal.

Sont surlignés en rouge, bleu clair, bleu foncé, vert, magenta et gris les résidus conservés respectivement à 100-90 %, 85-75 %, 70-60 %, 55-45 %, 40-30 %, 25-15 %. (Aur : auréocine ; Ent : entérocine ; Lnq : lacticine). La M1 de ces bactériocines est formylée.

L'entérocine L50, produite par *En. faecium* L50, est une bactériocine composée de deux peptides, l'entérocine L50A (EntL50A) et l'entérocine L50B (EntL50B) partageant 72 % de similarité de séquence (Cintas *et al.*, 1998) (**Figure I. 40**). L'EntL50A et l'EntL50B sont co-transcrites à partir de deux gènes présents sur le plasmide pCIZ1 (Cintas *et al.*, 1998). Chacun de ces deux peptides présente une forte activité antimicrobienne seul ou en association (Cintas *et al.*, 1998). S ce n'étant l'absence du peptide leader, l'action synergique des deux peptides EntL50A et EntL50B pourrait permettre de placer l'entérocine L50 dans la classe IIb. L'entérocine L50 est également produite par d'autres souches d'*Enterococcus* telles qu'*En. faecium* 6T1a et *En. faecium* MRR10-3. Elles sont respectivement appelées entérocine I/ J (Floriano *et al.*, 1998, Ruiz-Barba *et al.*, 2007) et entérocine MR10R/ MR10B (Martin-Platero *et al.*, 2006). Une autre bactériocine, l'entérocine RJ-11, est un peptide unique produit par *En. faecalis* RJ-11, similaire à l'EntL50A. Contrairement aux entérocines Ent50A et Ent50B, l'entérocine RJ-11 agirait probablement seule (Yamamoto *et al.*, 2003). En plus de porter les gènes codant la batériocines L50, le plasmide pC1Z2 renferme un gène codant une autre bactériocine de classe IId, l'entérocine Q (Cintas *et al.*, 2000). Les gènes codant les précurseurs des deux bactériocines sont généralement co-exprimés (Cintas *et al.*, 2000, Criado *et al.*, 2006).

- Bactériocines produites par des bactéries du genre *Staphylococcus*

Parmi ces bactériocines, l'auréocine A70 et l'auréocine A53 sont produites respectivement par *Sta. aureus* A70 et *Sta. aureus* A53 (Netz *et al.*, 2001, Netz *et al.*, 2002). L'auréocine A70 est composée de 4 peptides dépourvus de séquence signal : AurA, AurB, AurC et AurD (de Oliveira *et al.*, 1998) (**Figure I. 40**). AurA, AurB, AurC présentent une activité antimicrobienne lorsqu'ils sont présent seuls, mais aucune activité synergique entre ces trois peptides n'a été mise évidence. AurD ne peut pas être purifié séparément des autres peptides mais son homologie de séquence avec les autres peptides Aur suggère qu'AurD possèderait également une activité antimicrobienne (de Oliveira *et al.*, 1998). L'auréocine A53 présente une charge globale cationique ainsi qu'une séquence riche en tryptophane (Netz *et al.*, 2002). Elle est active contre un grand nombre de bactéries à Gram positif, telles qu'*En. faecium*, *Listeria innocua (Li. innocua)* ou *Sta. aureus*, avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'ordre du nanomolaire (Netz *et al.*, 2002).

- Bactériocines produites par des bactéries du genre *Lactobacillus*

D'autres bactériocines de la classe IId sont produites par des bactéries du genre *Lactobacillus* parmi lesquelles la lacticine Q (Fujita *et al.*, 2007) et la lacticine Z (Iwatani *et al.*, 2007) produites respectivement par *Lb. lactis* QU 5 et *Lb. lactis* QU14. Ces deux peptides présentent une homologie de séquence et leur méthionine *N*-terminale serait formylée (**Figure I. 40**). Par ailleurs, les lacticine Q et Z sont actives avec des CMI de l'ordre du nanomolaire contre des bactéries à Gram positif telles que *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* (Fujita *et al.*, 2007, Iwatani *et al.*, 2007). De plus, la séquence de la région *N*-terminale des lacticines Q et Z est proche de celle de l'auréocine A53.

c. Bactériocines « autres »

- La lactococcine A et les bactériocines homologues

La lactococcine A, produite par quelques souches de *Lc. lactis*, est la première bactériocine de classe IId identifiée et la mieux caractérisée à ce jour (Holo *et al.*, 1991, Stoddard *et al.*, 1992). Le système génétique impliqué dans la biosynthèse de la lactococcine A est situé sur le plasmide p94B4-6 chez *Lc. lactis* subsp. *cremoris* 9B4 (van Belkum *et al.*, 1991a) à l'origine de la production de deux autres bactériocines, la lactococcine B (van Belkum *et al.*, 1992) et la lactococcine M (van Belkum *et al.*, 1991a, van Belkum *et al.*,

1992). La séquence des peptides leader des lactococcines A, B et M sont très similaires, ceci serait dû à un mécanisme de maturation et d'export identique (**Figure I. 41**). Des bactériocines produites par d'autres genre bactériens sont très similaires à la lactococcine A. Parmi elles, la bovicine 255 est produite par *Streptococcus gallolyticus* LRC0255 (Whitford *et al.*, 2001) tandis que la thermophiline A est produite par *Str. thermophilus* ST134 (Ward et Somkuti, 1995) (**Figure I. 41**). De plus, toutes les bactériocines de ce groupe sont produites sous forme d'un précurseur qui est clivé au niveau du motif Gly-Gly lors de l'export.

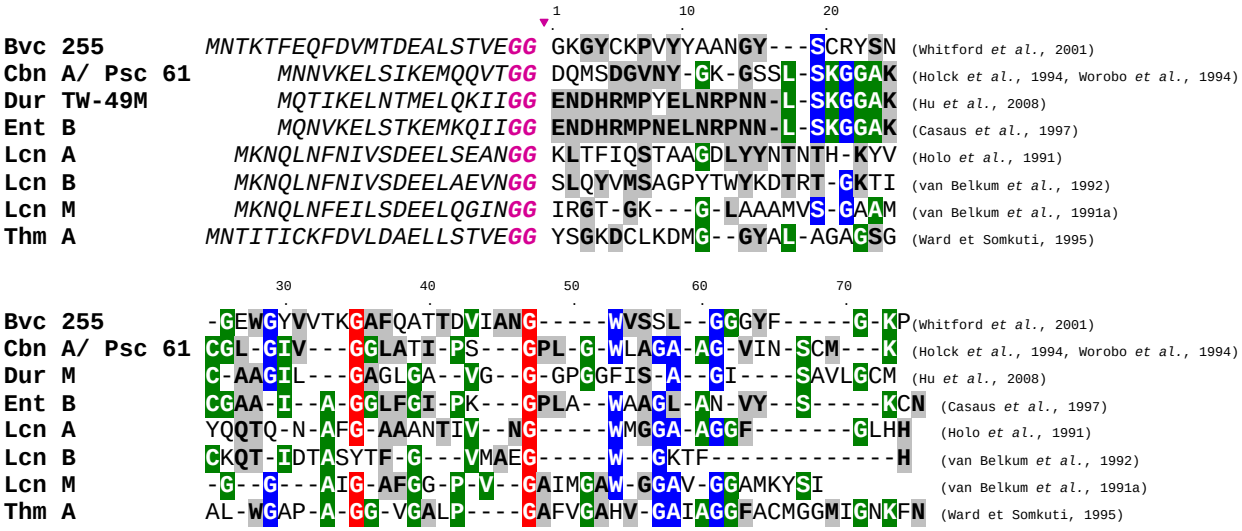


Figure I. 41. Alignement de séquences peptidiques des bactériocines de classe IId « autres ».

La séquence peptidique spécifique au précurseur est représentée en italique, le site de clivage (« GG ») est représenté en violet. Sont surlignés en rouge, bleu, vert et gris les résidus conservés respectivement à 100 %, 85-75 %, 60-50 % et 35-25 %. (Bvc : bovicine ; Cbn : carnobactériocine ; Ent : entérocine ; Lcn : lactococcine ; Thm : thermophiline).
▸ : Site de clivage.

- L'entérocine B et les bactériocines homologues

L'entérocine B est co-produite par *En. faecium* avec l'entérocine A, une bactériocine de classe IIa T136 (Casaus *et al.*, 1997, Håvarstein *et al.*, 1994). L'entérocine B présente des similarités de séquence avec les carnobactériocine A/ piscicoline 61 produites respectivement par *Carnobacterium piscicola* (*Cb. piscicola*) LV17A (Worobo *et al.*, 1994) et *Cb. piscicola* LV61 (Holck *et al.*, 1994). *Enterococcus durans* QU 49 produit la durancine TW-49M dont la région *N*-terminale est fortement semblable à celle de l'entérocine B (Hu *et al.*, 2008) (**Figure I. 41**).

IV.4.2. Mode d'action

La diversité de séquences peptidiques et de modes d'export chez la classe IId confère des modes d'action différents aux bactériocines de ce groupe. Nous nous limiterons aux bactériocines les plus étudiées, la lactococcine A, la lactococcine 972 et la lacticine Q.

a. La lactococcine A

La lactococcine A est active contre des bactéries phylogénétiquement proches et présente un spectre d'activité étroit (Holo *et al.*, 1991, van Belkum *et al.*, 1991b). Comme les bactériocines de classe IIa, la lactococcine A perméabilise la membrane cytoplasmique et perturbe le potentiel membranaire des bactéries cibles (van Belkum *et al.*, 1991b) en se fixant au récepteur mannose phosphotransférase EII^{t}_{Man} présent dans la membrane plasmique des bactéries cibles (Diep *et al.*, 2007). La protéine d'immunité de la lactococcine A, LciA, s'associerait à la membrane cytoplasmique (Nissen-Meyer *et al.*, 1993a, Venema *et al.*, 1994) en se fixant au complexe lactococcine A/EII^{t}_{Man}. Elle empêcherait ainsi la perméabilisation membranaire des bactéries productrices (Diep *et al.*, 2007). Il a été montré que les deux composants membranaires IIC et IID de EII^{t}_{Man} étaient impliqués dans l'interaction avec la LcnA et dans la formation du complexe avec la protéine d'immunité LciA (Diep *et al.*, 2007). Malgré les différences de séquence peptidique, d'autres bactériocines de classe IId comme la lactococcine B partagent ce même mode d'action (Diep *et al.*, 2007).

b. La lactococcine 972

La lactococcine 792 est une bactériocine de 66 acides aminés chargée positivement produite par *Lc. lactis* OPLA972 (Martínez *et al.*, 1999). Contrairement aux autres bactériocines de classe II, la lactococcine 792 n'agit pas sur la membrane cytoplasmique. En effet, elle agit sous forme d'homodimère et inhibe la biosynthèse du peptidoglycane, empêchant la formation des septa lors de la division cellulaire chez les bactéries du genre *Lactococcus* (Martínez *et al.*, 2000). De plus, la lactococcine 792 active le système de régulation à deux composants CesSR (Cell Enveloppe Stress) chez les bactéries sensibles (Martínez *et al.*, 2007). Le système CesSR, impliqué dans des voies de transduction de signal dépendantes des conditions extracellulaires, est très souvent activé lorsque le lipide II interagit avec un antibiotique (Mascher *et al.*, 2004). Des études montrant l'inhibition de la polymérisation du lipide II par la lactococcine 792 *in vitro* confirment l'interaction de la

bactériocine avec le lipide II (Martínez *et al.*, 2008). La lactococcine 792 est ainsi la première bactériocine non lantibiotique à interagir avec le lipide II.

c. La lacticine Q

La lacticine Q est responsable de la perméabilisation des membranes plasmiques des bactéries sensibles par formation de pores sans nécessiter une interaction avec un récepteur membranaire, contrairement à la grande majorité des bactériocines de classe IIa (Yoneyama *et al.*, 2009a). En interagissant avec les phospholipides membranaires (**Figure I. 42**), la lacticine Q induit la formation de pores toroïdes accompagnée d'un mouvement de « flip-flop » des phospholipides membranaires (Yoneyama *et al.*, 2009b) (**Figure I. 42**). Ce type de pores est retrouvé pour des peptides antimicrobiens produits par des eucaryotes tels que la magainine 2 (Yang *et al.*, 1998) et la mélittine (Lee *et al.*, 2004). La lacticine Q est, pour le moment, la seule bactériocine produite par des bactéries à Gram positif pour laquelle la formation de tels pores a été démontrée.

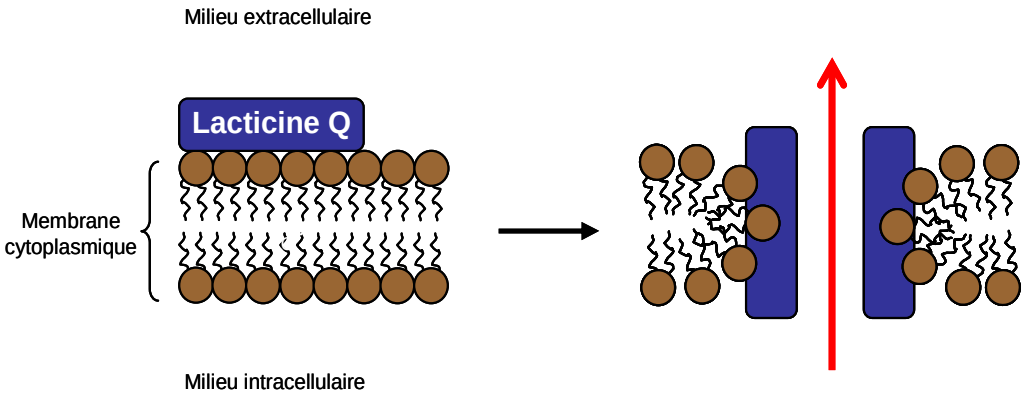


Figure I. 42. Représentation schématique de la formation de pores toroïdes par la lacticine Q d'après Yoneyama, F. *et al.*(Yoneyama *et al.*, 2009b).
La flèche rouge indique le flux d'ions et de molécules intracellulaires.

V. Les applications des bactériocines

V.1. Les bactériocines en agroalimentaire

La bioconservation des aliments fait l'objet depuis 40 ans de nombreuses études. Elle consiste en une augmentation de la durée de vie et une amélioration de la sécurité sanitaire des produits alimentaires, en utilisant des microorganismes et/ ou leurs métabolites (Ross *et al.*, 2002, Stiles, 1996).

L'HACCP (Hazard Analysis et Critical Control Points), 'analyse des dangers et des points critiques pour leur maîtrise', est un système de gestion qui identifie, évalue et maîtrise les dangers significatifs au regard de la sécurité des aliments. Malgré la mise en œuvre de technologies modernes et de concepts de sécurité sanitaires, l'HACCP n'est toujours pas arrivée à contrôler l'émergence de nouveaux pathogènes colonisant les denrées. Dans ce contexte, les bactéries lactiques et/ ou leurs métabolites utilisées depuis des millénaires d'une façon empirique par de nombreuses populations, peuvent contribuer à la conservation des aliments (Ross *et al.*, 2002) (**Tableau I. 3**) (*p.12-14*). C'est grâce aux propriétés antimicrobiennes de métabolites qu'ils synthétisent, tels que l'éthanol, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle (Atrih et Foster, 2001a), les composés antifongiques (Corsetti *et al.*, 1998), les acides phényl-lactiques (Lavermicocca *et al.*, 2000), les antibiotiques comme la reutéricycline (Höltzel *et al.*, 2000) et les bactériocines, que les bactéries lactiques sont reconnues comme de bons agents de conservation des produits alimentaires (Abee *et al.*, 1995, Klaenhammer, 1988). Afin de diminuer l'utilisation des additifs chimiques dans l'alimentation et d'obtenir des aliments prêts à la consommation et respectant les règles de la sécurité sanitaire, l'industrie agroalimentaire en Europe s'intéresse à l'utilisation des bactériocines comme bio-conservateurs (Robertson *et al.*, 2004).

L'absence de toxicité pour les cellules eucaryotes et la perte d'activité en présence des protéases présentes dans le tube digestif présentent des pripriétés qui pourraient placer les bactériocines parmi les substances sans danger pour l'Homme. Elles doivent cependant, pour le moment, être considérées comme un moyen de conservation complémentaire à ceux déjà existants (Deegan *et al.*, 2006). Pour améliorer leur conservation, les aliments sont soit supplémentés en bactéries productrices, la bactériocine étant produite *in situ* (p.12-14), soit en bactériocine *ex situ*.

Applications	Bactériocines		Classe	Effets	Références
Dans les produits laitiers	**Nisine**		I	Prévenir la prolifération d'endospores par *Cl. botulinum* et la contamination par *Li. monocytogenes* dans le fromage	(Wirjantoro *et al.*, 2001)
	Lacticine 3147		I	Inhibition de *Li. monocytogenes* dans les yaourts naturels et le fromage écrémé	(Morgan *et al.*, 2001)
	Pédiocine PA-1/ AcH		IIa	Inhibition de *Li. monocytogenes* dans les fromages blancs, crèmes et sauces à base de fromage	(Rodríguez *et al.*, 2002)
	Entérocine AS-48		IIc	Inhibition rapide de *Li. monocytogenes* et inhibition lente de *Sta. aureus* dans le lait écrémé	(Ananou *et al.*, 2010)
Dans les viandes et les volailles	**Nisine**	En combinaison avec des acides organiques, lysozyme, chélateurs	I	Décontamination des surfaces de préparations de viandes crues	(Thomas *et al.*, 2000)
		Sous forme de film, activée par de l'EDTA	I	Inhibition des entérobactéries et des espèces appartenant à *Carnobacterium* dans les tranches de bœuf pendant la réfrigération	(Ercolini *et al.*, 2010)
		En combinaison avec HPH	I	Inhibition d'*E. coli* et des *Staphylococcus* sp. dans le jambon cuit	(Garriga *et al.*, 2002)
	Pédiocines		IIa	Inhibition de *Li. monocytogenes* dans les viandes crues	(Rodríguez *et al.*, 2002)
Dans les poissons	**Nisine**	Traitée à la chaleur (65°C)	I	Inhibition totale de *Li. innocua* dans le caviar d'esturgeon ou de saumon (ikura)	(Al-Holy *et al.*, 2004)
		Immobilisée à des films plastiques	I	Inhibition de *Li. monocytogenes* dans le saumon fumé pendant la réfrigération	(Neetoo *et al.*, 2008)

Tableau I. 3. Exemples d'applications des bactériocines comme conservateurs alimentaires d'après Gálvez, A. *et al.* (Gálvez *et al.*, 2011).

V.1.1. Applications

La nisine (Rogers, 1928) est aujourd'hui la seule bactériocine légalement approuvée comme additif alimentaire (additif numéro E234) dans 80 pays. Elle a été évaluée comme sans danger pour l'Homme par l'organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (ONUAA) et l'Organisation Mondiale pour la Santé publique (OMS) en 1969 ainsi que par les autorités sanitaires Européennes en 1983. La nisine est commercialisée sous une forme semi-purifiée à l'état lyophilisé sous le nom de **Nisaplin™** (Danisco, France) (**Figure I. 43**) et de **Chrisin™** (Christen Hansen, Danemark) (Guinane *et al.*, 2005).



Figure I. 43. Nisaplin™.

(http://www.tradekorea.com/products/anti%20microbial.html?pageNum=3&linkFlag=2&outMax=10).

La nisine est souvent utilisée pour le contrôle de la prolifération de pathogènes tels que *Clostridium botulinum* (*Cl. botulinum*), *Cl. tyrobutyricum* et *Li. monocytogenes* dans les produits laitiers (Davies et Delves-Broughton, 1999). Elle est également utilisée dans d'autres produits alimentaires pasteurisés comme les crèmes glacées, les desserts sucrés à base de lait, les laits aromatisés et de jaune d'oeufs (Thomas *et al.*, 2000). De plus, l'effet antimicrobien de la nisine se trouve décuplé lorsqu'elle est associée à d'autres agents antimicrobiens comme le monolaurine, le système de lactoperoxidase (SLP), le lysozyme ou la reutérine (Gálvez *et al.*, 2007) ou à des hautes pressions hydrostatiques (HPH) (Black *et al.*, 2005).

D'autres bactériocines ont, depuis, été commercialisés sous la forme d'un concentré obtenu après fermentation par la souche productrice et atomisation d'un substrat alimentaire tel que le lait, par exemple. Considéré comme un ingrédient fermenté, ce type de préparation contiendra d'autres métabolites microbiens tels que l'acide lactique (Dortu et Thonart, 2009). Parmi ces produits, figure la pédiocine PA-1/ AcH, une bactériocine de classe IIa commercialisée sous le nom d'**Alta™ 2341** (Kerry Bioscience, Carrigaline, Co. Cork,

Ireland) (Deegan *et al.*, 2006). Elle est utilisée pour prévenir la contamination des fromages blancs, les crèmes fromagères et les produits carnés par *Li. monocytogenes* (Rodríguez *et al.*, 2002).

Des tests réalisés *in vitro* sur la lacticine 3147, un lantibiotique, ont montré qu'elle présentait un effet antimicrobien contre *Li. monocytogenes* et *Sta. aureus* dans les laits pour enfants et dans les fromages blancs (Deegan *et al.*, 2006, Morency *et al.*, 2001, O'Sullivan *et al.*, 2002, Ross *et al.*, 1999).

Une autre préparation commerciale, **Microgard™** (Danisco,France) renferme des propiocines produites par *Propionibacterium freudenreichii* spp. *shermanii* (Weber et Broich, 1986). Elle est préparée à partir de lait écremé (Microgard™ 100) ou de dextrose (Microgard™ 200) fermentés et souvent utilisée comme additif alimentaire dans les fromages blancs et yaourts.

Récemment, l'entérocine AS-48, une bactériocine de classe IIc, a montré des résultats prometteurs quant à l'inhibition de *Salmonella enterica* dans le lait écrémé (Martinez Viedma *et al.*, 2008). De plus, l'addition d'entérocine AS-48 sous forme lyophilisée à du lait écrémé inhibe la prolifération de *Li. monocyotgenes* et réduit progressivement le nombre des souches de *Sta. aureus* vivantes (Ananou *et al.*, 2010).

D'autres bactériocines produites par des bactéries autres que les bactéries lactiques sont également utilisées comme additif alimentaires. En effet, la variacine produite par *Kocuria varians* inhibe la prolifération de *Bacillus cereus* dans des desserts au chocolat et à la vanille (O'Mahony *et al.*, 2001).

V.1.2. Conditionnements

Les bactériocines sont utilisées sous forme purifiée, semi-purifiée ou sous la forme d'un concentré obtenu après fermentation d'un substrat alimentaire comme le lait ou la viande. Il est néanmoins, difficile de conditionner les bactériocines sous forme purifiée. En effet, la purification des bactériocines est une procédure longue et coûteuse qui nécessite de nombreuses étapes, à savoir une précipitation au sulfate d'ammonium, différentes combinaisons de chromatographies sur colonne par échange d'ions ou interactions hydrophobes et une étape finale de CLHP en phase inverse. Ces traitements sont difficilement applicables à l'échelle industrielle. Aussi, la stratégie souvent mise en œuvre consiste en l'adsorption de la bactériocine sur la cellule productrice, ce qui est rendu possible par son caractère généralement cationique, suivie d'une centrifugation (ou d'une ultrafiltration) de la

culture, puis de la désorption de la bactériocine par abaissement du pH (pH 2) et augmentation de la concentration en chlorure de sodium. Les bactériocines semi-purifiées sont ainsi conditionnées sous forme sèche par atomisation ou lyophilisation (Dortu et Thonart, 2009, Parente *et al.*, 1997).

Outre la forme lyophilisée des bactériocines, des nouvelles formes de conditionnement alimentaire ont été développées (Gálvez *et al.*, 2007). Afin d'améliorer la durée de vie de la bactériocine et d'en contrôler la diffusion au cours du processus de bioconservation, plusieurs formes de conditionnement sont aujourd'hui proposées. Parmi elles, l'adsorption des bactériocines dans des particules de silicone (Coventry *et al.*, 1996), l'encapsidation dans des liposomes (Colas *et al.*, 2007) ou l'incorporation dans différents matériaux (alginate de calcium, cellulose, protéines de soja, films de polysaccharides,…) (Luchansky et Call, 2004). La bactériocine sera ainsi libérée dans le produit au cours de la conservation.
Des emballages en polyéthylène ou autres films plastiques contenant des bactériocines ont également été développés. Ces emballages permettent de réduire la croissance des microorganismes pathogènes ou indésirables pouvant se développer en surface (Deegan *et al.*, 2006, Gálvez *et al.*, 2007, Luchansky et Call, 2004).

V.2. Les applications médicales des bactériocines

L'émergence de la résistance aux antibiotiques conventionnels ces dernières années a orienté la recherche vers l'étude de nouveaux agents antimicrobiens. Le mode d'action des bactériocines qui diffèrent de ceux des antibiotiques conventionnels et l'innocuité des bactériocines permettraient leur utilisation comme alternative aux antibiotiques dans la prévention et/ ou le traitement des infections dues à des bactéries devenues résistantes aux traitements conventionnels (Dicks *et al.*, 2011). Contrairement aux applications alimentaires des bactériocines, aucune de bactériocine n'est à ce jour commercialisée comme médicament. Cependant, quelques-unes d'entre elles sont en cours d'essais cliniques pour le traitement d'infections cutanées, respiratoires, systémiques et/ ou urogénitales ainsi qu'en tant qu'agents contraceptifs parmi elles la rBPI21 en phase clinique III pour le traitement de la méningite (Hancock, 2000).

V.2.1. Applications

a. Traitements d'infections cutanées

L'émergence de souches de *Sta. aureus* multi-résistantes incluant une résistance à la méthicilline (SARM) pose, depuis longtemps, un réel problème dans les traitements d'infections nosocomiales cutanées (Taylor *et al.*, 1992). La vancomycine est un antibiotique à usage strictement hospitalier considéré comme le seul traitement pour les infections aux SARM. La mersacidine est un lantibiotique produit par *Bacillus* sp. HIL Y-85,54728 active contre de nombreuses bactéries pathogènes telles *Listeria*, *Staphylococcus* ou *Streptococcus* dont les SARM (Sass *et al.*, 2008). Injectée par voie intra-nasale chez des souris infectées par des SARM et traitées à l'hydrocortisone, la mersacidine est active à des concentrations de 1, 5 et 10 mg/l contre les SARM, la CMI étant égale à 1 mg/l (Kruszewska *et al.*, 2004). Comme la vancomycine, la mersacidine agit en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne chez les bactéries à Gram positif (*p.39*) mais elle vise une cible différente, ce qui permettrait d'associer les deux agents antimicrobiens dans un même traitement et de contourner ainsi la résistance bactérienne (Chatterjee *et al.*, 1992). De plus, la mersacidine est active contre *Propionibacterium acnes*, une espèce bactérienne rencontrée dans certains problèmes cutanés responsables d'acné, ce qui pourrait lui conférer une utilisation potentielle dans le traitement de ce type d'infection (Niu et Neu, 1991). La lacticine 3147, un autre lantibiotique, inhibe la prolifération de *Sta. aureus* et des SARM à différents pH ce qui permettrait d'envisager sont utilisation contre ces infections (Galvin *et al.*, 1999). D'autres bactériocines du groupe des lantibiotiques comme l'épidermine et la gallidermine produites respectivement par *Staphylococcus epidermis* (*Sta. epidermis*) et *Staphylococcus gallinarum* sont actives contres *Sta. aureus* et *Sta. epidermis* à des CMI de 4 et 8 mg/l (Kellner *et al.*, 1988).

b. Traitements de la gingivite

La gingivite est une inflammation des gencives associée à la plaque dentaire. La plaque dentaire est générée par un biofilm principalement formé de bactéries du genre *Staphylococcus* ou *Streptococcus* (Farge, 1998). Des tests *in vivo* réalisés chez les chiens ont montré l'efficacité des lantibiotiques, comme la nisine, dans la prévention de formation de plaques dentaires et d'apparition de gingivites (Howell *et al.*, 1993). Depuis lors, la nisine a été introduite dans des bains de bouche.

BLIS K12™ (Bacteriocin Like Inhibitory Substances K12™), est un produit commercial contenant des souches de *Str. salivarius* qui produisent deux bactériocines, la

salivaricine A2 et B actives contre des bactéries responsables de la mauvaise haleine (Tagg, 2004) (**Figure I. 44**).



Figure I. 44. BLIS K12™ .
(http://www.shopnewzealand.co.nz/en/cp/BLIS_Throat_Guard).

c. Traitements de la mastite

La mastite est une infection bactérienne des glandes mammaires causée par des bactéries pathogènes telles que *Sta. aureus*, *Streptococcus agalactiae* (*Str. agalactiae*) et *Streptococcus uberis* (*Str. uberis*) et survenant pendant la période d'allaitement. Elle provoque une importante perte économique dans l'industrie laitière (Bradley, 2002, Riffon *et al.*, 2001). Administrée par voie intra-mammaire chez les vaches, la nisine A inhibe la prolifération des souches de *Staphylococcus* et *Streptococcus* à l'origine de cette infection (Broadbent *et al.*, 1989, Cotter *et al.*, 2005a).

d. Traitements de l'otite

L'otite est l'infection la plus répandue chez les enfants âgés de moins de 2 ans (Segal *et al.*, 2005). Elle est causée par des bactéries à Gram positif comme *Haemophilus influenzae* productrices de β-lactamases, *Moraxella catarrhalis*, *Sta. pneumoniae* multi-résistants, *Sta. aureus*, *Str. pyrogenes* et des bactéries à Gram négatif comme *P. aeruginosa* (Segal *et al.*, 2005). La forme la plus grave de la maladie peut entraîner une surdité chronique (Roland et Stroman, 2002).

La nisine présente un effet bactéricide rapide contre *Sta. pneumoniae* à l'origine d'otite chez la souris à des concentrations inférieures à 1 mg/l. Elle pourrait remplacer l'utilisation de la vancomycine pour le traitement de ce type d'infection afin d'éviter l'apparition de résistance (Goldstein *et al.*, 1998, Mota-Meira *et al.*, 2000). La bactériocine ST4SA, une bactériocine de classe IIa, produite par *Enterococcus mundtii* est active contre les

bactéries à Gram positif responsables d'infections dans l'oreille moyenne (Knoetze *et al.*, 2008). ST4SA est plus active que d'autres agents antimicrobiens tels que les aminoglycosides, céphalosporines, quinolones, fluoroquinolones et lincosamides, macrolides, nitroimidazole, pénicilline et vancomycine contre des pathogènes responsables d'infections de l'oreille moyenne. Ceci suggère que ST4SA pourrait faire l'objet d'un nouveau traitement de l'otite (Knoetze *et al.*, 2008).

e. Traitements d'infections systémiques

Les bactériocines de classe II sont généralement actives contre des bactéries pathogènes à l'origine d'infections systémiques par *Li. monocytogenes*, *H. pylori*, *Sta. aureus* ou *P. aeruginosa* ((Czuprynski *et al.*, 2002, Harbarth *et al.*, 1998). L'activité anti-*Listeria* des bactériocines de classe II suggère une utilisation potentielle de ces bactériocines pour prévenir la listériose. La listériose est une infection à *Li. monocytogenes* particulièrement grave lorsqu'elle survient chez la femme enceinte, les enfants, les personnes âgées ou immunodéprimées. Malgré les nombreux tests réalisés *in vitro* avec les bactériocines de classe II contre les bactéries du genre *Listeria*, très peu ont fait l'objet de tests *in vivo*. Lorsqu'elles sont injectées chez des souris infectées par *Li. monocytogenes*, la piscicoline 126 et l'abp-118, deux bactériocines respectivement des classes IIa et IIc, inhibent la prolifération du pathogène (Corr *et al.*, 2007, Ingham *et al.*, 2003). La divercine V41, une autre bactériocine de classe IIa, a récemment présenté une activité antimicrobienne dirigée contre *Li. monocytogenes* EGDe *in vivo* chez la souris (Rihakova *et al.*, 2010).

H. pylori est une bactérie exclusivement retrouvée dans l'estomac humain impliquée dans l'apparition d'ulcères, de gastrites chroniques et/ ou de cancers gastriques lors d'infections graves. D'autres espèces d'*Helicobacter* ont, cependant, été identifiées chez d'autres mammifères, ainsi que chez certains oiseaux. La nisine produite par les laboratoires AMBI (Purchase, New York) a passé avec succès les tests cliniques de phase I et peut dès lors être considérée comme un futur traitement contre des infections dues à ce pathogène. Par ailleurs, deux laboratoires pharmaceutiques, Astra et Merck ont déjà commercialisé la nisine pour traiter des infections gastriques et des ulcères causés par *H. pylori*. (Dicks *et al.*, 2011).

f. Traitements d'infections urogénitales et contraception

La flore vaginale est composée d'un grand nombre d'espèces bactériennes parmi lesquelles *Lb. acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* (*Lb. rhamnosus*), *Sta. epidermis*,

Micrococcus luteus,... *Lactobacillus* sp. constitue le genre bactérien le plus important dans la flore vaginale chez la femme saine et assure une protection contre les infections vaginales et urinaires en acidifiant le milieu et en produisant des bactériocines (Nomoto, 2005).

Différents *Lactobacillus* sp. ont depuis longtemps été utilisés pour développer des traitements préventifs et curatifs contre des infections vaginales (Barbés et Boris, 1999, Maggi *et al.*, 2000). Administrés par voie vaginale et orale chez la guenon, *Lb. rhamnosus* GR-1 et *Lactobacillus fermentum* (*Lb. fermentum*) inhibent la prolifération d'*E. coli* à l'origine d'infections urinaires et de champignons responsables de vaginose (Reid et Bruce, 2001). D'autres études similaires ont été entreprises mais aucune n'a encore abouti à un traitement.

La subtilosine A est un lantibiotique produit par *B. subtilis* (Babasaki *et al.*, 1985) actif contre des pathogènes parmi lesquels *Li. monocytogenes*, *Gardnerella vaginalis* (*G. vaginalis*), *Str. agalactiae* et *Micrococcus luteus* (Sutyak *et al.*, 2008a). Son activité restreinte à *G. vaginalis* permet un maintien de la flore commensale intacte (Sutyak *et al.*, 2008a). Des tests de cytotoxicité de la subtilosine A réalisés *in vitro* en utilisant un modèle de tissu cervical humain (Mat, Ashland, MA) ont montré qu'elle détruisait seulement 5% des cellules après 24 h d'exposition (Sutyak *et al.*, 2008a). L'innocuité de la subtilosine A à la flore commensale vaginale ainsi qu'aux tissus humains la place parmi les meilleurs candidats à un futur traitement aux infections vaginales. En plus d'inhiber la prolifération des pathogènes à l'origine d'infections vaginales, la subtilosine A a un effet spermicide. Testée *in vitro* sur des spermatozoïdes humains, la subtilosine A inhibe leur motilité à une IC_{50} de 64,5 µg/ml (Sutyak *et al.*, 2008b).

V.2.2. Conditionnements

Malgré les résultats prometteurs des bactériocines quant aux applications potentielles dans le domaine médical, leur nature peptidique engendre une instabilité une fois dans les milieux biologiques. Plusieurs formes ont été proposées afin de contourner ce problème parmi lesquelles la forme de distribution des bactériocines entourée d'un film polymérique sous forme de nanoparticules. Le film polymérique d'acide lactique (PolyLactic Acide, PLA) est l'un des seuls polymères utilisables pour l'administration de bactériocines chez l'Homme qui soit accepté par la FDA (Nair et Laurencin, 2007). L'encapsidation de la nisine dans du PLA pour former des nanoparticules (Salmaso *et al.*, 2004) permet la libération de la bactériocine

active en fonction de la concentration en sels et le pH du milieu, permettant ainsi de cibler le site d'action, pendant plus de 1000 heures. D'autres formes d'administrations plus récentes comme les nanofibres (Heunis et Dicks, 2010) présentent des résultats prometteurs et pourraient être également utilisées comme futures formes de conditionnements.

V.3. Limites d'utilisation des bactériocines

L'application des bactériocines constitue certes une méthode « naturelle » de conservation des aliments, mais sa mise en oeuvre n'est pas aisée. En effet, les nombreuses propriétés des bactériocines favorisant leur utilisation dans le domaine agroalimentaire et/ ou médical n'empêchent pas l'existence de contraintes relatives à leur utilisation. Le coût élevé de préparations de bactériocines pures prêtes à l'emploi (*p.86-87*) entraîne de loin la limite la plus importante. D'où l'utilisation plus commune des souches productrices plutôt que des bactériocines isolées.

La composition de l'aliment représente le premiers facteur pouvant réduire ou totalement dissiper l'activité inhibitrice de la bactériocine en raison de son adsorption sur des composants du produit, la limitation de sa solubilité et de sa diffusion, sa dégradation par des protéases, l'interaction avec des additifs alimentaires ou des ingrédients et/ ou un pH inapproprié. Les traitements appliqués aux produits constituent un deuxième facteur pouvant limiter l'effet antimicrobien de la bactériocine dans un produit alimentaire. En effet, des traitements thermiques trop élevés peuvent dégrader les bactériocines bien que la majorité d'entre elles soient résistantes à la chaleur (Dortu et Thonart, 2009, Gálvez *et al.*, 2007). Le dernier facteur limitant l'activité des bactériocines est la présence de bactéries résistantes et de microorganismes qui dégradent les bactériocines par l'effet de protéases qu'elles produisent à l'état physiologique. De plus, dans les produits solides, les bactéries forment des biofilms dont la résistance aux bactériocines peut être plus élevée (Schöbitz *et al.*, 2003). D'autre part, il sera également important de considérer l'impact de la bactériocine sur la flore résidente. La sensibilité de la flore à la bactériocine entraine un déséquilibre qui peut conduire à la croissance et la prolifération de microorganismes pathogènes résistants aux bactériocines (Dortu et Thonart, 2009).

I. Méthodes bactériologiques

I.1. Souches et plasmides

I.1.1. Souches bactériennes

Le **tableau M. 1** répertorie les souches bactériennes utilisées lors des tests antibactériens et lors de la production de la bactériocine; la souche productrice est indiquée en gras.

Tableau M. 1. Souches bactériennes utilisées.

Souches	Source	Conditions de culture
Bactéries à coloration Gram positive		
Bacillus subtilis subsp. *subtilis* CIP 52.65	Institut Pasteur	LB, 30°C, 180 rpm
Bacillus cereus CIP 66.24	Institut Pasteur	LB, 30°C, 180 rpm
Enterococcus faecalis CIP 103015	Institut Pasteur	BHI, 37°C, 180 rpm
Enterococcus faecalis CIP 103214	Institut Pasteur	BHI, 37°C, 180 rpm
Enterococcus faecium CIP 103014	Institut Pasteur	BHI, 37°C, 180 rpm
Enterococcus faecium HKLHS	Leon Dicks (Stellenbosch University)	BHI, 37°C, 180 rpm
***Leuconostoc pseudomesenteroides* KM432Bz**	**Leon Dicks (Stellenbosch University)**	**MRS, 30°C, sans agitation**
Lactobacillus plantarum CIP 104454	Institut Pasteur	MRS, 30°C, sans agitation
Lactobacillus plantarum subsp. *plantarum* CIP 102305	Institut Pasteur	MRS, 30°C, sans agitation
Lactobacillus sakei subsp. *sakei* CIP 103139	Institut Pasteur	MRS, 30°C, sans agitation
Leuconostoc carnosum CIP 103319	Institut Pasteur	MRS, 30°C, sans agitation
Leuconostoc citreum CIP 103315	Institut Pasteur	MRS, 30°C, sans agitation
Leuconostoc gelidum CIP 103318	Institut Pasteur	MRS, 30°C, sans agitation
Leuconostoc lactis CIP 102422	Institut Pasteur	MRS, 30°C, sans agitation
Leuconostoc mesenteroides subsp. *cremoris* CIP 103009	Institut Pasteur	MRS, 30°C, sans agitation
Leuconostoc mesenteroides subsp. *dextranicum* CIP 102423	Institut Pasteur	MRS, 30°C, sans agitation
Leuconostoc mesenteroides subsp. *mesenteroides* CIP 102305	Institut Pasteur	MRS, 30°C, sans agitation
Leuconostoc pseudomesenteroides CIP 103316	Institut Pasteur	MRS, 30°C, sans agitation
Listeria innocua CIP 80.11	Institut Pasteur	BHI, 37°C, 180 rpm

Listeria ivanovii subsp. *ivanovii* N29 ATCC 19119	Leon Dicks (Stellenbosch University)	BHI, 37°C, 180 rpm
Listeria ivanovii subsp. *ivanovii* CIP 78.42	Institut Pasteur	BHI, 37°C, 180 rpm
Listeria monocytogenes CIP 80.110	Institut Pasteur	BHI, 37°C, 180 rpm
Listeria monocytogenes EGDe CIP 107776	Institut Pasteur	BHI, 37°C, 180 rpm
Listeria monocytogenes EGDe (*rpoN* $^{-}$)	Yann Héchard (Université de Poitiers)	BHI+5µg ml érythromycine, 37°C, 180 rpm
Staphylococcus aureus subsp. *aureus* CIP 4.83	Institut Pasteur	LB, 37°C, 180 rpm
Streptococcus salivarius CIP 102503	Institut Pasteur	TSYE, 37°C, 180 rpm
Streptococcus pneumoniae CIP102911	Institut Pasteur	TSYE, 37°C, 180 rpm
Streptococcus thermophilus CIP 102303	Institut Pasteur	LB, 37°C, 180 rpm
Weissella paramesenteroides CIP 102421	Institut Pasteur	MRS, 30°C, sans agitation
Bactéries à coloration Gram négative		
Escherichia coli DH5α	AM Pons (Université de la Rochelle)	LB, 37°C, 180 rpm
Escherichia coli K12 RYC1000 (pBR322^{+})	Felipe Moreno (Hospital Ramon y Cajal, Madrid)	LB, 37°C, 180 rpm
Klebsiella pneumoniae subsp. *ozaenae* CIP 52.211	Institut Pasteur	LB, 37°C, 180 rpm
Klebsiella pneumoniae subsp.*pneumoniae* CIP 82.91	Institut Pasteur	LB, 37°C, 180 rpm

I.1.2. Plasmides

Les vecteurs utilisés dans cette étude sont répertoriés dans le **tableau M. 2** et leur cartographie est représentée dans les **figures M. 1** et **M. 2**.

Tableau M.2. Caractéristiques des plasmides utilisés.

Plasmides	**Taille (kb)**	**Caractéristiques**	**Source**
pBR322 (**Figure M.1**)	4,46	Amp^{r} Tet^{r}	*E. coli* K12 RYC 1000 pBR322
pGEM®-T Easy Vector (**Figure M.2**)	3,01	LacZ^{+}	Promega

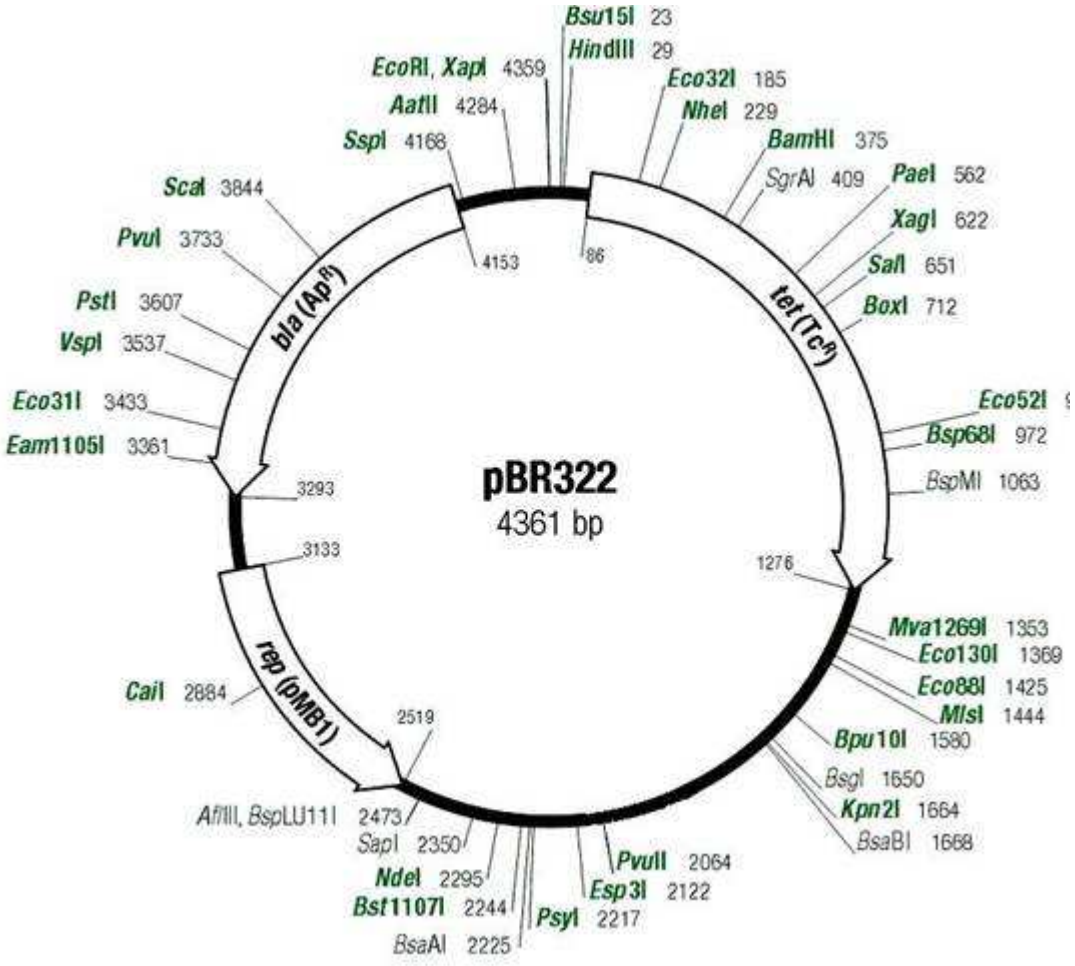


Figure M. 1. Vecteur pBR322 (*E. coli* K12 RYC 1000).

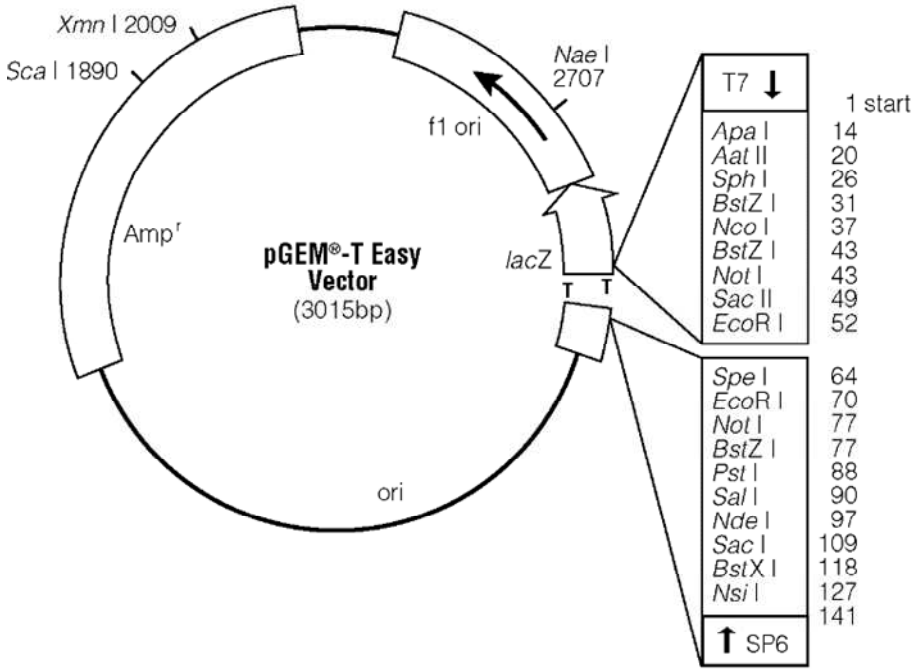


Figure M. 2. Vecteur pGEM®-T Easy (*Promega*).

I.2. Milieux de culture

I.2.1. Milieux liquides

Les milieux de culture utilisés dans cette étude ainsi que leur composition sont présentés dans le **tableau M. 3**.

Tableau M. 3. Composition des milieux de culture utilisés.

Nom		**Composition**	**g/l**
MRS	de Man Rogosa Sharpe (*BD Biosciences*)	Peptone de caséine, digestions trypsiques	10
		Extrait de viande	10
		Extrait de levure	5
		Glucose	20
		Tween 80	1
		K_2HPO_4	2
		CH_3CO_2Na	5
		$C_6H_{14}N_2O_7$ (citrate d'ammonium)	2
		$MgSO_4$; 7 H_2O	0,2
		$MnSO_4$; H_2O	0,1
		pH 6,2 - 6,5.	
BHI	Brain Heart Infusion (*BD Biosciences*)	Infusion de cervelle de veau	7,7
		Infusion de cœur de bœuf	9,8
		Protéose peptone	10
		Glucose	2
		NaCl	5
		HNa_2PO_4	2,5
		pH 7,2 - 7,6	
LB	Luria Bertani	Hydrolysat trypsique de caséine (BD Biosciences)	10
		Extrait de levure (BD Biosciences)	5
		pH 7	
TSYE	Trypticase Soy Yeast Extract	Digestion pancréatique de caséine (BD Biosciences)	17
		Digestion trypsique de soja (BD Biosciences)	3
		Glucose (Sigma)	2,5
		NaCl (Sigma)	5
		K_2HPO_4 (Sigma)	2,5
		pH 7 - 7,2	

I.2.2. Milieux gélosés

Les milieux gélosés ont été obtenus par addition aux bouillons de cultures d'agar (*BD Biosciences*) à la concentration de 20 g/l pour les géloses dures et de 6,5 g/l pour les géloses molles.

I.2.3. Antibiotiques

Les antibiotiques utilisés dans cette étude sont répertoriés dans le **tableau M-4**. Ils proviennent de chez *Sigma*.

Tableau M. 4. Caractéristiques des antibiotiques utilisés.

Antibiotique	**Concentration en µg/ml (solvant)**	**Utilisation**
Ampicilline	50 (eau)	Sélection clones pBR322^{+} Tests antimicrobiens
Chloramphénicol	37 (éthanol)	Tests antimicrobiens
Erythromycine	5 (eau)	Culture de la souche EGDe *rpoN* $^{-}$
Kanamycine	50 (eau)	Tests antimicrobiens
Tétracycline	50 (éthanol)	Sélection clones pBR322^{+}

Les antibiotiques utilisés ont été conservés dans leur solvant respectif (**Tableau M. 4**) à -20°C. (l'ampicilline, la kanamycine et la tétracycline sont stockées à la concentration de 100 µg/ml, l'érythromycine à 50 µg/ml et le chloramphénicol à 50 µg/ml).

I.3. Identification bactérienne

I.3.1. Coloration Gram

Mise en place par le médecin danois Gram en 1884, la technique de la coloration de Gram est la méthode la plus utilisée dans l'étude et la classification des bactéries en fonction de la composition de leur paroi. Les bactéries sont colorées en violet par un colorant basique tel que le violet de gentiane puis par une solution de lugol et enfin soumises à l'action de l'alcool. Le violet de gentiane se fixe sur des composants cytoplasmiques et donne aux bactéries une coloration violette. Chez les bactéries à Gram négatif, la paroi est pauvre en peptidoglycane laissant ainsi passer l'alcool ce qui entraîne la décoloration du cytoplasme. En revanche, chez les bactéries à Gram positif, la paroi est riche en peptidoglycane ce qui constitue une barrière imperméable à l'alcool, ainsi le cytoplasme demeure coloré en violet.

Une coloration à la safranine, nous permet après visualisation au microscope (objectif 100/ grossissement × 1000), de distinguer les bactéries à Gram négatif, qui précédemment décolorées à l'éthanol, adoptent alors une teinte rose alors que les bactéries à Gram positif conservent la première coloration violette.

L'identification par coloration de Gram est réalisée en utilisant le kit « Gram-color » (*IVD*). Une colonie a été prélevée à partir d'une culture sur boite et étalée sur une lame de verre. La lame a ensuite été séchée à l'air libre, passée à la flamme afin de fixer l'échantillon puis laissée refroidir à l'air libre. Après fixation, la lame a été posée sur un porte-objet et colorée avec le violet cristallisé pendant 1 min avant d'être rincée au lugol. Recouverte avec du lugol pendant 1 min, la préparation a ensuite été rincée à l'eau distillée pendant environ 5 s. La lame ainsi rincée, a été soumise à une décoloration à l'éthanol pendant environ 15 s jusqu'à ce que l'étalement ait pris une couleur gris-bleu puis rincée à l'eau distillée pendant environ 5 s avant d'être colorée à la safranine pendant 1 min, rincée à nouveau à l'eau distillée puis séchée. Les lames ont été observées au microscope (objectif 100/ grossissement × 1000).

I.3.2. Galerie API

La souche productrice a été identifiée en utilisant une galerie API® 50 CHL Medium (*bioMérieux*, France) destinée à identifier des bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* et apparentées en étudiant le métabolisme des 49 sucres de la galerie.

La bactérie à tester a été inoculée dans chaque tube de la galerie contenant un substrat différent sur lequel elle allait réagir. Pendant l'incubation, le catabolisme des glucides conduit à la production d'acides organiques qui provoquent le virage de l'indicateur de pH ce qui donne une coloration différente à chaque cupule.

La souche *Ln. pseudomesenteroides* KM432Bz a été isolée sur boite MRS et cultivée pendant une nuit à 30°C. Plusieurs colonies identiques de la souche productrice de bactériocine ont été prélevées et inoculées dans 2 ml de milieu API 50 CHL jusqu'à obtenir une suspension dense. La suspension bactérienne ainsi obtenue a été diluée dans 5 ml de milieu API 50 CHL jusqu'à obtenir une absorbance à 600 nm (A_{600nm}) égale à 0,45 (égale à 2 McFarland) en transférant un nombre de goutte (n) à partir de la première suspension dense. 2 x n gouttes de la seconde suspension ont ensuite été transférées dans 5 ml de milieu API 50 CHL. Après homogénéisation, le milieu API 50 CHL ainsi inoculé a été réparti dans les tubes de la galerie et les tests recouverts d'huile de paraffine pour éviter un éventuel dégagement gazeux. La

galerie a été incubée à 30°C pendant 48 h. Le profil biochimique obtenu a été analysé à l'aide d'un logiciel d'identification :

http://www.techmicrobio.eu/index.php?option=com_content&view=article&id=149&Itemid=191

I.4. Activité antibactérienne

I.4.1. Tests en milieu solide

Les tests antibactériens en milieu solide ont été réalisés afin d'examiner l'activité antimicrobienne de la bactériocine contre des souches bactériennes potentiellement sensibles. Les tests antimicrobiens en milieu solide nous ont permis d'isoler les fractions actives obtenues au cours de la purification et de réaliser un spectre d'activité de la leucocine KM432Bz. Les tests antibactériens ont été réalisés en milieu solide sur milieu gélosé spécifique à chaque souche cible recouvert d'une gélose molle de même type contenant 10^7 bactéries/ml de cette souche cible.

Des cultures bactériennes des bactéries cibles ont été réalisées à partir de précultures de la nuit (les conditions de culture sont présentées dans le **tableau M. 1**). Les bactéries cibles ont été cultivées jusqu'à ce que l'A_{620nm} soit comprise entre 0,2 et 0,4. Une suspension de la culture bactérienne a été mélangée à de la gélose molle de la manière suivante :

Le volume de la culture bactérienne (µl) inoculé à 10 ml de gélose molle = 30/ A_{620nm}.

5 µl du produit à tester ont ensuite été déposés directement sur la gélose molle préalablement mélangée à la bactérie cible. Des contrôles positifs ont été réalisés en déposant 5 µl d'ampicilline (50 µg/ml) sur le mélange gélose molle/ bactérie cible.

L'ensemble a ensuite été cultivé pendant la nuit. Les diamètres des zones d'inhibition de croissance ont été mesurés après 16 h de culture.

I.4.2. Tests en milieu liquide

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant la plus petite concentration provoquant l'inhibition de la croissance bactérienne.

Pour cela, les bactéries sensibles ont été cultivées jusqu'à ce que l'A_{620nm} soit comprise entre 0,2 et 0,4. Les cultures bactériennes ont ensuite été diluées dans le milieu ayant servi à leur culture de manière à obtenir une A_{620nm} finale de 10^{-3} et de 5. 10^{-4} pour les souches bactériennes du genre *Listeria (Li.)*. 10 µl de différentes dilutions de la leucocine KM432Bz et de la pédiocine (*Sigma*) dans du tampon acétate d'ammonium 25 mM pH 6,5 (10 µM, 5 µM, 2,5 µM, 1,25 µM, 624 nM, 315 nM, 156 nM, 78 nM,39 nM, 19,5 nM) ont été incubés

dans une plaque 96 puits avec 90 µl des suspensions bactériennes préparées précédemment. L'ensemble a été cultivé sans agitation pendant 16 h et pendant 13 h pour les souches bactériennes du genre *Listeria (Li.)*. Des contrôles ont été réalisés en incubant la suspension bactérienne préparée seule ainsi que le milieu de culture seul. La croissance bactérienne a été estimée par mesure de l'A_{620nm} à l'aide d'un lecteur de plaque Multiskan FC (*Thermo Scientific*®).

Afin de déterminer si l'effet est bactéricide ou bactériostatique, 100 µl des suspensions bactériennes où l'on n'a pas observé de croissance bactérienne ($A_{620nm} \leq 10^{-3}$et 5.10^{-4} pour les bactéries du genre *Li.*) ont été prélevés des puits puis déposés sur des boîtes de pétri. La boite de pétri ensemencée a été incubée pendant 16 h. Les colonies bactériennes ont été ensuite comptées.

I.4.3. Effet de la leucocine KM432Bz sur la croissance bactérienne

Une culture de *Lb. sakei* ou de *Li. monocytogenes* a été réalisée à partir d'une préculture de la nuit jusqu'à ce que l'A_{620nm} soit comprise entre 0,2 et 0,4. La culture a ensuite été diluée jusqu'à obtenir une A_{620nm} égale à 0,1. 90 µl de la suspension bactérienne ainsi préparée ont été incubés dans une plaque 96 puits à 30°C sans agitation. 10 µl de la leucocine KM432Bz (10 µM) ont été rajoutés à la suspension bactérienne lorsque celle-ci atteint une A_{620nm} égale à 0,2. Un contrôle positif a été réalisé en incubant 100 µl de la suspension bactérienne sans bactériocine dans les conditions décrites précédemment. L'A_{620nm} est mesurée toutes les 30 min pendant 13 h à l'aide d'un lecteur de plaques Multiskan FC (*Thermo Scientific*®).

Une mesure à 24 h de l'A_{620nm} a été réalisée pour déterminer si l'effet de la bactériocine est bactériostatique ou bactéricide sur la bactérie cible.

I.5. Biofilms

Un biofilm est formé d'une seule espèce ou d'une communauté plus ou moins complexe de microorganismes, adhérant entre eux et à une surface produisant ainsi une matrice protectrice résistante.

I.5.1. Formation de biofilms

Chaque bactérie sensible à la leucocine KM432Bz a été cultivée jusqu'à une A_{620nm} comprise entre 0,2 et 0,4. Les suspensions bactériennes ont ensuite été diluées jusqu'à A_{620nm}

égale à 10^{-3}. 100 µl ont été déposés sur plaque 96 puits et cultivés à température optimale de croissance bactérienne sans agitation pendant 48 h afin de permettre l'adhésion des bactéries au support. Les puits ont ensuite été vidés et lavés à l'eau MilliQ® stérile jusqu'à obtention d'une solution de lavage limpide puis séchés pendant 30 min à température ambiante (TA). 125 µl de Crystal Violet 0,4% (m/v) dans de l'eau MilliQ® ont été rajoutés à chaque puits. L'ensemble a été incubé pendant 45 min à TA. Les puits ont ensuite été lavés à l'eau MilliQ® stérile. Les lavages ont été répétés jusqu'à ce que l'eau de lavage soit limpide. Les puits ont été séchés pendant 10 min à TA. 200 µl d'éthanol 97% (v/v) dans de l'eau MilliQ® ont été ajoutés à chaque puits. 100 µl de la suspension éthanol-Crystal Violet ont ensuite été transférés dans un nouveau puits avant de mesurer l'A_{620nm} et A_{595nm}. Un contrôle négatif utilisant le milieu de culture seul a été réalisé. On considère que l'on a un biofilm si les différences $A_{620nm} - A_{620nm\ (milieu\ de\ culture\ seul)}$ et $A_{595nm} - A_{595nm\ (milieu\ de\ culture\ seul)}$ sont supérieures ou égales à 0,2.

I.5.2. Effet de la leucocine KM432Bz sur la faisabilité des biofilms

Les conditions de culture initiales et de quantification de biofilm sont décrites dans le chapitre I.5.1. 90 µl de la suspension bactérienne à une A_{620nm} égale à 10^{-3} ont été déposés dans une plaque 96 puits auquels on a rajouté 10 µl de la bactériocine à 5 et 10 µM. Les plaques ont ensuite été incubées à 30°C sans agitation pendant 48 h.

I.5.3. Effet de la leucocine KM432Bz sur les biofilms

Les conditions de culture initiales et de quantification de biofilm sont décrites dans le chapitre I.5.1. 90 µl de la suspension bactérienne à une A_{620nm} égale à 10^{-3} ont été déposés dans une plaque 96 puits auquels et incubées à 30°C sans agitation pendant 48 h. On a rajouté ensuite 10 µl de la bactériocine à 5 et 10 µM. Les plaques ont ensuite été incubées sans agitation pendant 48 h.

II. Méthodes de biologie moléculaire

II.1. Manipulation d'ADN

II.1.1. Purification

a. Extraction d'ADN génomique

L'ADN génomique de la souche productrice *Ln. pseudomesenteroides* KM432Bz a été extrait puis purifié sur des colonnes de silice grâce au kit « Genomic DNA Mini kit » (*Invitrogen*). Cette technique est basée sur l'interaction de l'ADN avec la silice constituant les colonnes en présence de sels chaotropiques.

L'ADN génomique bactérien de la souche *Ln. pseudomesenteroides* KM432Bz a été extrait à partir de 200 ml de culture bactérienne ensemencés la veille. La culture bactérienne a été centrifugée pendant 15 min à 8000 g. La lyse de la paroi bactérienne a été réalisée en resuspendant le culot bactérien dans du lysozyme à 20 mg/ml (*Sigma*) suivi d'une incubation pendant 30 min à 37°C. Le lysozyme est responsable de l'hydrolyse du peptidoglycane, constituant de la paroi des bactéries à Gram positif. Les protéines associées à l'ADN ont ensuite été hydrolysées en incubant la suspension bactérienne en présence de protéinase K à 20 mg/ml pendant 30 min à 55°C. De l'éthanol 100% ainsi que le tampon de fixation ont été rajoutés au lysat afin de permettre à l'ADN génomique de s'accrocher à la silice constituant les colonnes. Les impuretés ont été éliminées par des lavages successifs des colonnes par un tampon de lavage fourni avec le kit. L'ADN génomique pur a été, ensuite, élué par de l'eau MilliQ®.

b. Extraction d'ADN plasmidique

- Bactéries à Gram négatif

Les plasmides ont été extraits et purifiés par échange d'ions grâce au kit « Plasmid Midi Kit » (*Qiagen*) à partir d'une culture bactérienne de 50 ou 100 ml ensemencés la veille.

Les parois bactériennes ont été lysées suivant la procédure de la lyse alcaline (*Maniatis*). Cette méthode permet de préparer l'ADN plasmidique des bactéries, tout en éliminant l'ADN du chromosome bactérien. Le principe de cette méthode consiste à effectuer la lyse des cellules au moyen d'un détergent, le dodécyl sulfate de sodium (SDS) en présence de soude à pH 8. Après dénaturation de l'ADN, la solution a ensuite été rapidement neutralisée provoquant ainsi la renaturation brutale de l'ADN. L'ADN chromosomique, très long ne parvient pas à se réapparier complètement et forme des enchevêtrements insolubles alors que

l'ADN plasmidique plus court parvient à se renaturer et reste en solution. On sépare alors les deux espèces par centrifugation. Les protéines précipitées, ont également été éliminées avec le détergent et l'ADN chromosomique. L'ADN plasmidique a ensuite été extrait et purifié sur des colonnes de résine échangeuse d'ions préalablement équilibrées. Les impuretés ont été éliminées par des lavages successifs en utilisant un tampon de lavage fourni par le kit et l'ADN plasmidique élué par de l'eau MilliQ®.

- Bactéries à Gram positif

La lyse bactérienne a été réalisée selon le protocole d'extraction d'ADN plasmidique d'Anderson et McKay (Anderson et McKay, 1983) à partir d'une culture bactérienne de la souche *Ln. pseudomesenteroides* KM432Bz de 200 ml ensemencés la veille. Les parois ont été hydrolysées par lyse enzymatique au lysozyme à 10 mg/ml *(Sigma)* pendant 1 h à 37°C puis par traitement à la protéinase K à 20 mg/ml *(Sigma)* pendant 1 h à 55°C afin d'hydrolyser les protéines encore associées à l'ADN. La lyse a été complétée par agitation pendant 30 s suivi d'une incubation pendant 10 min à 37°C.

Les plasmides présents dans la souche *Ln. pseudomesenteroides* KM432Bz ont été extraits et purifiés par échange d'ions à l'aide du kit « Plasmid Midi Kit » (*Qiagen*) suivant le principe décrit chez les bactéries à Gram positif.

II.1.2. Dosage d'ADN

a. Au spectrophotomètre

La concentration ainsi que la pureté de l'ADN ont été déterminées par spectroscopie UV à 260 nm et 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Uvikon 9x3 w (*Bioserv*).

La pureté de l'ADN a été évaluée par le rapport A_{260nm} sur A_{280nm}. L'ADN est considéré comme contaminé par de l'ARN ou des protéines si ce rapport est respectivement supérieur à 2 ou inférieur à 1,65. La concentration de l'ADN, exprimée en µg/ml, a été calculée en multipliant l'A_{260nm} par la quantité d'ADN par unité de DO : 50 µg/ml.

b. Sur gel d'agarose

La concentration d'ADN a été estimée après électrophorèse sur gel d'agarose et exposition aux UV (voir II.2.2.), en comparant l'intensité des bandes d'ADN d'intérêt aux bandes du marqueur du poids moléculaire dont la concentration est connue.

II.1.3. Digestions

Environ 1 µg d'ADN plasmidique a été digéré par 1 UE des enzymes de restriction suivantes : *Apa*I, *BamH*I, *EcoR*I, *Hind*III, *Kpn*I, *Nco*I, *Sma*I (*New England Biolabs, NEB*) dans les conditions recommandées par le fournisseur en présence de tampon spécifique à chaque enzyme de restriction (*NEB*) dans un volume final de 10 µl. *Apa*I, *BamH*I et *Kpn*I ont été utilisées en présence d'albumine de sérum bovin (BSA) à 10 µg/ml final. L'ensemble des digestions a été incubé pendant la nuit à 37°C. La réaction enzymatique a été arrêtée par une incubation à 65°C pendant 20 min pour inactiver l'enzyme.

II.2. Amplification d'ADN

Les amorces oligonucléotidiques utilisées dans cette étude sont présentées dans le **tableau M. 5**.

Tableau M. 5. Amorces oligonucléotidiques utilisées.

N°	Nom	Séquence 5' → 3'	Tm* (°C)	Spécificité de séquence/ localisation
1	M13-F	TTTTCCCAGTCACGACG	52	pGEM-T Easy Vector/176–197
2	M13-R	ACACAGGAAACAGCTATGACC	56	pGEM-T Easy Vector /2949–2972
3	leuco_deg_1_f	AAGTATTATGGKAATGGWGT	50,1	Prébactériocine*
4	LeucoA-790R	CACCATACCCAGCGTCAT	56	Prébactériocine/ 481-498**
5	LeucoA-F2	ACGACTTGTTCGAGAGCA	53,7	Prébactériocine/ 718-735**
6	PréleuB-R	AACATGAAATCTGCGGATAA	56	Prébactériocine/ 759-776**
7	PréleuB-F	ACCAGAAACCATTTCCACCA	60	Prébactériocine/ 600-619**
8	Leuco_deg_2_f	AAGTATTATGGKAAYGGWGT	51,2	Prébactériocine/ prot. dimmunité*
9	Leuco_deg_3_f	AAZTATTATGGDAAYGGDGT	48,1	Prébactériocine/ prot. dimmunité*
10	Leuco_deg_1_r	AARGCGTCTCCCCAGTTWAC	58,3	Prébactériocine/ prot. dimmunité*
11	Leuco_deg_2_r	AARGCGTCWCCCCAZTTWAC	56,3	Prébactériocine/ prot. dimmunité*
12	LeucoA-150R	TTGCATACCCTGTCTCCA	53,7	Prébactériocine/ prot. dimmunité/ 927-944**
13	LeucoA-591F	GCCATGTATTGGCCGTTT	53,7	Protéine d'immunité/ 281-299**
14	LeucoA-1032F	ATAAACCGCTCACGGACT	53,7	Protéine d'immunité/ 50-67**
15	LeucoA-F1	TGGAGACAGGGTATGCAA	53,7	Protéine à fonction inconnue/ 922-939**
16	LeucoA-R	GGCATTAGCGTCCGTAAA	53,7	ABC transporteur/ 2205-2222**
17	LcaD-R1	TTGCATTTGGTCATTATTCA	55	ABC transporteur/ 2395-2414**
18	LcaD-R2	CTGTTGAGCGCTTTAATCGT	55	ABC transporteur/ 2466-2485**
19	LcaD_F	GCCAAAACTGACATGGAAGG	57,3	ABC transporteur/ 1536-1554**
20	LcaD_R	GCACCGGAGAATCGACTAAA	57,3	ABC transporteur/ 1526-1543**
21	LcaD_IC210_R	CCTTCCATGTCAGTTTTGGC	57,3	ABC transporteur/ 1524-1543**
22	LcaD_IC211_F	TTTAGTCGATTCTCCGGTGC	57,3	ABC transporteur/ 1524-1543**
23	mesC_R1	TTGGAAAATTGCGGTAACG	52,4	ABC transporteur/ 3621-3639**
24	mesC_R2	CATAGCACTTTGGCTGGAA	54,5	ABC transporteur/ 2727-2745**
25	203_IC	GCTCTCGAACAAGTCGT	52,8	ABC transporteur/ 718-735**
26	pBR322_F	CATGTTTGACAGCTTATCATCG	56,5	pBR322/ 5-26
27	pBR322_R1	GTGCCTGACTGCGTTAGC	58,2	pBR322/ 63-80
28	pBR322_R2	ACGATGAGCGCATTGTTAGA	55,3	pBR322/ 92-111
29	23f	GAGTTTGATCCTGGCTCAG	58	ARN 16S/ 10-28
30	1385r	CGGTGTGTRCAAGGCCC	57	ARN 16S/ 1392-1408

* : Amorces dégénérées déterminées à partir d'alignement de séquences.

** : La localisation de toutes les amorces oligonucléotidiques utilisées au cours de l'étude a été déterminée à partir de la séquence de la leucocine A (**Figure II.3.** p.156). Seules les amorces dont les résultats sont exposés sont représentées sur la figure II.3.

La Tm (« melting Temperature ») a été calculée à l'aide du logiciel Primer3Plus (*http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi)*.

II.2.1. Réaction de PCR (Polymerase Chain Reaction)

L'amplification d'ADN des gènes codant la leucocine KM432Bz, de la protéine d'immunité ainsi que l'ABC transporteur présents sur le cluster impliqué dans la biosynthèse de la leucocine KM432Bz a été réalisée en utilisant environ 1 µg d'ADN plasmidique extrait de la souche *Ln. pseudomesenteroides* KM432Bz comme matrice et des amorces

oligonucléotidiques à 10 nM décrites dans le **tableau M. 5**, 1 UE de la polymérase Taq (*Promega*), dNTP à 10 µM (*Promega*) et $MgCl_2$ à 20 mM (*Promega*) dans un volume final de 50 µl de tampon 1X (*Promega*). La réaction de PCR a été réalisée suivant le cycle de température : [5 min à 95°C puis 35 cycles (30 s à 94°C, 30 s à 55°C, 3 min à 72 °C), puis 5 min à 72°C].

Un contrôle négatif en absence d'ADN et un contrôle positif utilisant les amorces oligonucléotidiques 29 et 30 amplifiant un fragment d'ADN codant l'ARN 16 S ont été réalisés pour chacune des réactions PCR suivant le cycle de température décrit précédemment. Les réactions PCR ont été réalisées à l'aide d'un thermocycleur Veriti Thermal Cycler (*AB Applied Biosystems*).

II.2.2. Electrophorèse sur gel d'agarose

La technique d'électrophorèse sur gel d'agarose a été utilisée pour séparer les acides nucléiques, chargés négativement, sous l'effet d'un champ électrique.

a. Champ continu

5 µl des fractions d'ADN, préalablement mélangés au tampon de migration 1X final (*NEB*), ont été déposés sur un gel à 0,5, 1, 1,5 ou 2 % d'agarose (*Qbiogene*) dans du tampon TAE 1X (tampon TAE : Tris 40 mM, acide acétique 0,001% (v/ v) et EDTA 0,001% (v/ v), pH 8). La migration a été réalisée à 100 V pendant 20 min à l'aide d'un générateur Power Universal® (*Biorad*). La visualisation de l'ADN a été réalisée soit après incubation du gel dans 300 ml de tampon TAE contenant 1 µg/ ml de bromure d'éthidium (BET) ou bien directement après migration dans un gel d'agarose contenant du gel Red 0,0005% (v/ v) (*VWR*). Le gel a été placé sur un transilluminator relié à une caméra (*MiniBis Bioimaging System*). Les images obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel Gel Capture.

Les marqueurs de poids moléculaires « 1 kb DNA Ladder » (*NEB*) et « 100 bp DNA Ladder » (*NEB*) ont été utilisés à raison d'1 µg/ puits.

b. Champ pulsé

La méthode d'électrophorèse en champ continu n'ayant pas permis de séparer le plasmide renfermant le cluster de gènes impliqué dans la biosynthèse de la leucocine KM432Bz, la technique d'électrophorèse en champ pulsé a donc été utilisée.

L'électrophorèse en champ pulsé est une méthode utilisée pour séparer des fragments d'ADN d'une taille moléculaire allant jusqu'au mégabase (Mb). Le principe de cette électrophorèse consiste à alterner l'orientation du champ électrique au cours du temps permettant ainsi aux molécules d'ADN de grandes tailles de se réorienter dans le gel à chaque changement d'orientation du champ électrique et de passer à travers les mailles du gel. Le passage de l'ADN à travers les mailles du gel d'agarose dépend de la masse moléculaire, de la structure 3D de la molécule ainsi que de la vitesse de migration du fragment d'ADN dans le gel.
10 µl de la préparation d'ADN plasmidique purifiée selon le procédé présenté en II.1.1. ont été déposés sur un gel à 1,2% d'agarose (*Qbiogene*) dans du tampon TBE 0,5X (tampon TBE: Tris 44,5 mM, acide borique 44,5 mM et EDTA disodique 1 mM, pH 8). La séparation a été réalisée à l'aide du programme de migration suivant : température 14°C, angle 120°, voltage 6 V/ cm, temps de pulse initial 0,2 s, temps de pulse final 8,5 s, pendant 15 h dans un système d'électrophorèse Chef-DR® III Pulsed Field Electrophoresis System (*Bio-Rad*). L'ADN a été visualisé suivant la même procédure présentée dans le paragraphe I.2.2.a. Les marqueurs de poids moléculaires utilisés sont « MidRange I PFG Marker » à raison de 0,5 µg/puits (*NEB*) et « Low Range PFG Marker » à raison de 0,25 µg/puits (*NEB*).

II.2.3. Interaction sonde-ADN

a. Transfert sur membrane Hybond

- "Southern Blot"

Après migration électrophorétique des préparations d'ADN plasmidique natif et digéré, le gel d'agarose a été exposé aux UV pendant 2 min pour fixer les acides nucléiques. Le gel a ensuite été traité par un tampon dénaturant (NaOH 0,5 M et NaCl 1,5 M) pendant 45 min à température ambiante afin de permettre la dénaturation de l'ADN bicaténaire et de faciliter le transfert des acides nucléiques sur la membrane d'hybridation puis l'accès de la sonde au brin d'ADN complémentaire, lavé dans de l'eau MilliQ® pendant 30 min puis mis en contact d'une solution neutralisante (Tris 1 M et NaCl 1,5 M, pH 7,4) pendant 30 à 60 min avant d'être transféré par capillarité sur une membrane Hybond^{TM}-N^{+} (*GE Healthcare*) (**Figure M-3**) pendant une nuit à TA. Après transfert, la membrane a été lavée au SSC 20X (NaCl 3 M et citrate trisodique 0,3 M, 2 H_2O, pH 7) pendant 10 min avant d'être exposée aux UV et enfin séchée dans une étuve (*Memmert*) à 80 °C afin de fixer l'ADN sur la membrane sous forme covalente.

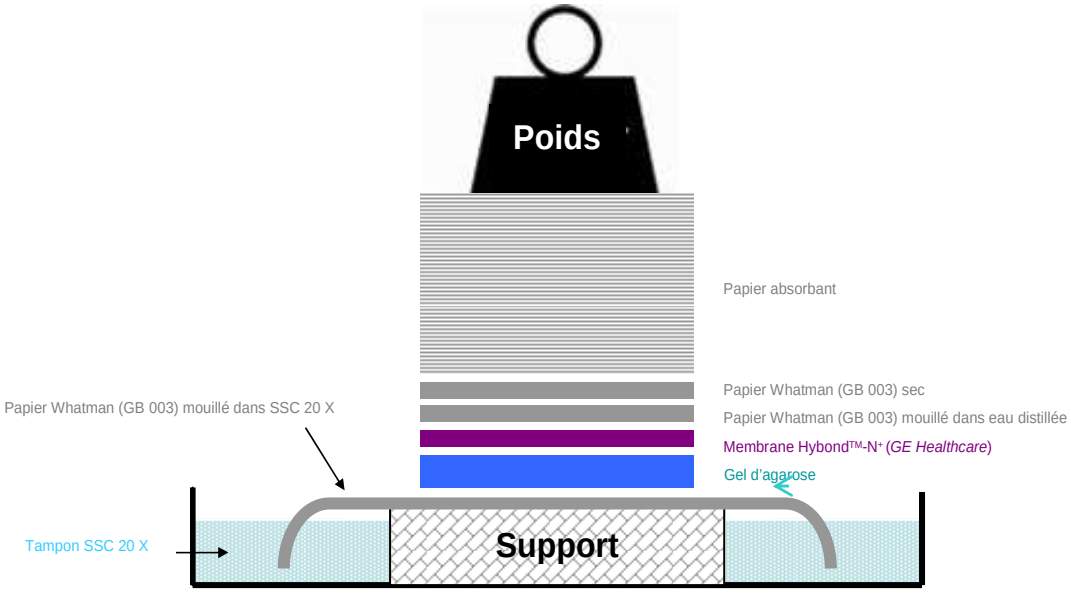


Figure M. 3. Montage du transfert d'acides nucléiques sur membrane Hybond^{TM}-N^{+}.

- "Dot Blot" :

1 µl de la culture bactérienne en phase stationnaire de croissance a été directement déposé sur une membrane Hybond^{TM}-N^{+} puis séché à TA. Deux papiers Whatman (GB 003) ont été imbibés de solution dénaturante et neutralisante respectivement et déposés successivement sur la membrane sèche pendant 2 à 3 min. La membrane a ensuite été transférée dans une solution neutralisante pendant 10 min puis dans une solution contenant du SSC 2X et du SDS 0,1% (m/v) afin d'éliminer les débris cellulaires résiduels avant un lavage par une solution de SSC 0,3X.

Les membranes ont ensuite été séchées puis conservées à 4°C entre deux papiers Whatman (GB 003) en vue d'une utilisation ultérieure.

b. Marquage de la sonde à la ***digoxygénine***-11-dUTP (DIG-11dUTP)

La sonde est formée d'un fragment d'ADN renfermant le gène codant la leucocine KM432Bz obtenu par PCR utilisant les amorces oligonucléotidiques 6 et 7 (**tableau M. 5**). La sonde a été purifiée en utilisant le kit Geneclean® (*MP Biomedicals*) puis marquée à la digoxygénine (DIG) (**Figure M. 4**) à l'aide de la technique de « random priming ». La technique de « random priming » consiste à polymériser le brin complémentaire de l'ADN d'intérêt (ou de la sonde) en utilisant des hexamères monobrins (brins composés de six nucléotides aléatoires) comme matrice au fragment de Klenow de l'ADN polymérase I. La

polymérisation a été réalisée à l'aide d'un mélange de dNTP dont un marqué à la digoxygénine (DIG-11dUTP). Le brin d'ADN néosynthétisé qui aurait incorporé le DIG-11dUTP serait alors marqué et servirait de sonde lors de l'hybridation.

Le mode opératoire du marquage est décrit dans le kit « DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II » (*Roche*).

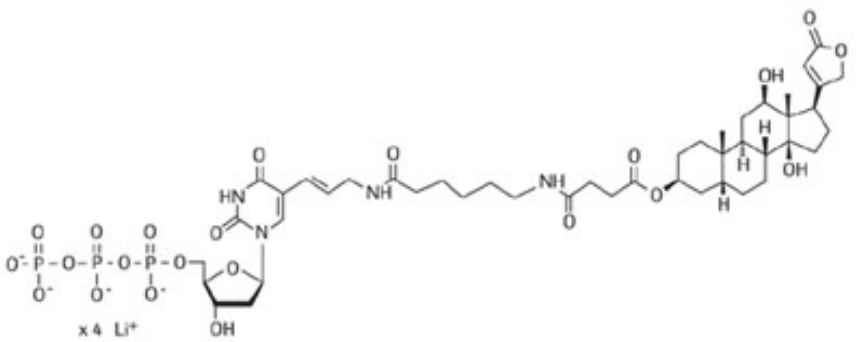


Figure M. 4. La digoxygénine-11-dUTP (DIG-11dUTP).

La quantité d'ADN marqué a été déterminée en suivant la procédure de détection immunologique de révélation décrite par le fournisseur en utilisant un ADN contrôle préalablement marqué à la DIG fourni par le fournisseur.

c. Hybridation

Environ 1 µg d'ADN marqué a été dénaturé 5 min à 94°C avant d'être mis en contact avec la membrane Hybond^{TM}-N^{+} (voir partie II.2.4.a.) dans un tampon d'hybridation (Tampon DIG Easy Hyb) fourni par le kit « DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II » (*Roche*) suivant le procédé décrit par le kit. L'hybridation de la sonde d'ADN avec la membrane a été réalisée à 55°C pendant la nuit avec rotation dans des tubes d'hybridation dans un four à hybridation Isotemp (*Fisher Scientific*).

d. Détection et révélation du signal

Les sondes hybridées ont été détectées immunologiquement en ajoutant des anticorps anti-DIG fourni par le kit « DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II » (*Roche*) puis visualisées grâce à la chimioluminescence émise suite à la déphosphorylation du substrat chimioluminescent de la phosphatase alcaline : le disodium 2-chloro-5-(4-methoxyspiro [1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1(3,7)] decan]-4-yl)-1-phenyl phosphate (CSPD) (**Figure M. 5**).

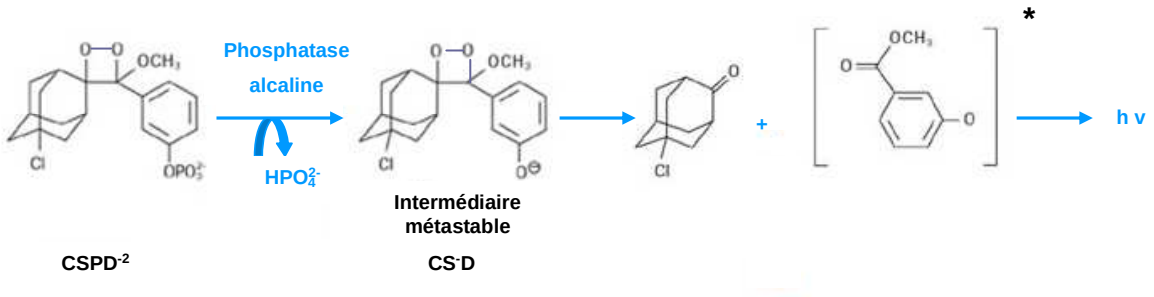


Figure M. 5. Déphosphorylation du CSPD par la phosphatase alcaline (« DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II » (*Roche*)).

La chimioluminescence est basée sur une émission de lumière provoquée par la dissipation de l'énergie d'une molécule qui se trouve dans un état excité par une réaction chimique. La déphosphorylation du CSPD par la phosphatase alcaline provoque une émission de lumière dans le domaine du visible avec un maximum d'absorbance à 477 nm. Pour cela, la membrane a été lavée par du SSC 2X en présence de SDS 0,1% (m/v), deux fois pendant 5 min puis par du SSC 0,5X deux fois pendant 15 min avant d'être traitée suivant les recommandations du fournisseur. Le signal a été révélé par chimioluminescence à l'aide d'un appareil de Fusion Fx7 (*Vilber Lourmat*).

e. Déshybridation et conservation de la membrane

Afin d'hybrider la membrane Hybond^{TM}-N^{+} avec une nouvelle sonde, cette dernière a été déshybridée suivant l'une des deux méthodes suivantes :

- Déshybridation thermique

La membrane a été immergée trois fois dans 500 ml de solution bouillante de SDS à 0,1% (m/v) puis rincée par une solution SSC 2X avant d'être séchée dans une étuve (*Memmert*) à 80°C.

- Déshybridation chimique

La membrane a été rincée abondamment deux fois avec de l'eau distillée puis lavée avec du NaOH 0,2 M contenant du SDS 0,1% (m/v) pendant 15 min à 37°C. La membrane a ensuite été rincée 5 min avec une solution SSC 2X avant d'être séchée dans une étuve (*Memmert*) à 80°C et conservée à 4°C entre deux feuilles de papier Whatman (GB 003) secs.

II.3. Clonages

II.3.1. Préparation des inserts d'ADN

Les inserts d'ADN ont été obtenus soit par PCR (II.2.1.) soit par digestion enzymatique par *Hind*III (*II.1.3.*).

Les inserts d'ADN obtenus par digestion enzymatique par *Hind*III ont été directement extraits à partir du gel à 0,5% d'agarose (*Qbiogene*) dans du tampon TAE puis ont été visualisés sur plaque UV suivant la même procédure présentée dans le paragraphe I.2.2.a.

La purification des fragments d'ADN a été réalisée directement à partir du produit PCR ou bien par élution du gel d'agarose suivant le procédé commercial fourni par le kit « Geneclean Turbo » (*MP Biomedicals*).

II.3.2. Préparation des vecteurs

Les caractéristiques des vecteurs utilisés sont présentées dans le **tableau M. 2**.

a. Digestion

Le plasmide pGEM®-T Easy a été fourni sous forme linéaire par le kit commercial « pGEM®-T Easy vector system » (*Promega*). Il n'était donc pas nécessaire de le digérer avant la réaction de ligation. La digestion du vecteur pBR322 (environ 1 µg) a été réalisée en rajoutant 1 UE d'*Hind*III, (*NEB*) et 2 µl de tampon Tris-HCl 10 mM, NaCl 50 mM, $MgCl_2$ 10 mM, Dithiothreitol 1 mM, pH 7.9 (*NEB*) dans un volume final de 10 µl pendant une nuit à 37°C. La réaction enzymatique a ensuite été arrêtée par une incubation à 65°C pendant 20 min.

b. Déphosphorylation

Les plasmides pBR322 linéarisés après digestion enzymatique ont été déphosphorylés avant la réaction de ligation afin d'éviter l'autoligation des plasmides. Les groupements phosphate présents à l'extrémité 5' du vecteur ont été éliminés sous l'action de la phosphatase alcaline empêchant ainsi la formation de ponts phosphodiester entre les deux extrémités ainsi déphosphorylées du plasmide avant traitement à la ligase. La réaction de déphosphorylation a été réalisée en ajoutant à 1 µg de plasmide, 1 UE de phosphatase alcaline extraite d'intestin de veau (*NEB*) et 2 µl de tampon Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 10 mM, dithiothréitol 1 mM, pH 7.9 (*NEB*) dans un volume final de 20 µl. L'ensemble a été incubé à 37°C pendant 1 h. La réaction enzymatique a ensuite été arrêtée par une incubation à 65°C pendant 20 min.

Afin d'éliminer les réactifs ayant servi à la digestion et à la déphosphorylation, les plasmides ont été purifiés grâce au procédé commercial « Geneclean Turbo® » (*MP Biomedicals*).

II.3.3. Ligation (conditions)

La masse de l'insert utilisé pour la ligation dépend de sa taille ainsi que de la taille et la quantité du plasmide dans lequel cet insert est intégré. Pour la ligation utilisant les deux vecteurs, la masse d'insert nécessaire à chaque réaction de ligation a été calculée en suivant la formule suivante :

$$\textit{Masse insert (ng)} = \frac{\textit{masse vecteur (ng)} \times \textit{taille de l'insert (kb)}}{\textit{taille du vecteur (kb)}} \times \frac{\textit{[insert]}}{\textit{[vecteur]}}$$

Des rapports molaires insert /vecteur de 6:1, 9:1, 10:1, 15:1, 20:1 ont été réalisés.
Afin d'éliminer les réactifs, les produits de ligation ont été purifiés avant transformation des cellules compétentes à l'aide du kit « Geneclean Turbo® » (*MP Biomedicals*) puis quantifiés après migration sur gel à 1% d'agarose (*Qbiogene*). Le procédé de quantification est présenté dans le pragaraphe II.1.2.

a. pGEM®-T Easy

La ligation des fragments d'ADN dans le vecteur pGEM®-T Easy a été réalisée selon le procédé commercial (*Promega*).
L'isopropyl β-D-1 thiogalactopyranoside (IPTG), un analogue du galactose, induit l'expression de la β-galactosidase qui hydrolyse à son tour le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-Gal), un substrat chromogène, donnant ainsi une coloration bleue aux colonies bactériennes. Le site de ligation étant situé dans le gène *lacZ* codant la β-galactosidase, l'insertion d'une séquence d'ADN dans le vecteur inactive l'enzyme qui n'est plus exprimée dans les bactéries transformées même en présence d'IPTG. L'X-Gal n'est donc plus hydrolysé et les bactéries porteuses d'un plasmide recombinant observées sont alors de couleur blanche.
La réaction de ligation a été réalisée en utilisant 50 ng de vecteur pGEM-T Easy® auxquels sont rajoutés 3 UE de ligase de l'ADN du phage T4 (*Promega*), 5 µl de tampon 2X (*Promega*) et d'insert, dont la masse a été calculée suivant le rapport présenté dans le paragraphe II.3.3., dans un volume final de 10 µl. L'ensemble a été incubé à 4°C pendant la

nuit. Un contrôle positif de ligation comprenant un insert d'ADN témoin fourni par le kit a été réalisé dans les conditions de ligation décrites précédemment.

b. pBR322

La réaction de ligation a été réalisée en mélangant 50 à 70 ng de plasmide linéarisé par *Hind*III suivant les mêmes conditions de digestions présentées dans le paragraphe II.1.3., 1 UE de ligase d'ADN d'*E. coli* (*NEB*), 2 µl de tampon Tris-HCl 30 mM, $MgCl_2$ 4 mM, NAD 26 µM, dithiothréitol 1 mM, BSA 50 µg/ml, pH 8.0 (*NEB*) et d'insert, dont la masse a été calculée suivant le rapport présenté dans le paragraphe II.3.3., dans un volume final de 10 µl pendant une nuit à 4 °C.

II.3.4. Préparation de cellules compétentes

Afin de faciliter la transformation bactérienne par choc thermique, les bactéries d'*E. coli* DH5α ont été rendues compétentes par perméabilisation de leur paroi après traitement chimique au chlorure de calcium ($CaCl_2$) (Dagert et Ehrlich, 1979).

E. coli DH5α a été cultivée dans 50 ml de milieu LB à 37°C sous agitation pendant 2 heures jusqu'à une A_{620nm} égale à 0,2. Les cellules ont été ensuite centrifugées à 3500 g pendant 12 min à 4°C et le culot bactérien repris dans 20 ml de $CaCl_2$ 0,1 M froid et incubé 20 min dans de la glace. L'ensemble a ensuite été centrifugé à 3500 g pendant 10 min à 4°C avant d'être resuspendu dans 0,5 ml de $CaCl_2$ 0,1 M. Les bactéries ainsi traitées ont ensuite été incubées pendant la nuit à 4°C dans de la glace.

II.3.5. Transformation

50 µl des bactéries rendues compétentes ont été transformées avec 10 à 100 ng d'ADN issu du mélange de ligation après une incubation de 10 min sur glace puis d'un choc thermique à 37°C pendant 5 min. Les bactéries ont ensuite été cultivées dans 1 ml de LB pendant 2 h. 100 µl des suspensions bactériennes ont été étalés sur des milieux sélectifs (ampicilline 100 µg/ml, IPTG 0,5 M et X-Gal 80 µg/ml pour le vecteur pGEM-T® Easy/ ampicilline 100 µg/ml pour pBR322) et incubés à 37°C pendant une nuit.

Des bactéries non transformées, utilisées comme contrôle de stérilité, ont été étalées sur les mêmes milieux sélectifs décrits précédemment. D'autres bactéries transformées avec 10 à 100 ng de plasmide non recombinant, selon le même protocole de transformation décrit précédemment, ont été utilisées comme contrôle de compétence des bactéries.

II.3.6. Sélection des clones

Les colonies observées sur boîtes ont été sélectionnées et repiquées sur des boîtes de même composition.

Afin de vérifier que les clones ont bien intégré l'insert, une amplification par PCR en utilisant le cycle de température suivant [5 min à 95°C puis 35 cycles (30 s à 94°C, 30 s à 55°C, 3 min à 72 °C), puis 5 min à 72°C] à l'aide d'un thermocycleur Mastercycler Personal (*Eppendorf*) a été réalisée en utilisant une colonie bactérienne (dans 20 µl d'eau distillée stérile) de chacun des clones positifs sélectionnés comme matrice et les amorces oligonucléotidiques servant à amplifier l'insert (1 et 2 pour le vecteur pGEM®-T Easy / 6 et 7 pour le vecteur pBR322 (**Tableau M. 5**). Les conditions expérimentales de la préparation des échantillons sont présentées dans le paragraphe II.2.1.

II.4. Séquençage

Le séquençage d'ADN a été réalisé par les sociétés Eurofins MWG et Genomics. L'interprétation logicielle des chromatogrammes a été vérifiée manuellement.

III. Production et purification de la bactériocine KM432Bz

III.1. Culture de la souche KM432Bz

La souche *Ln. pseudomesenteroides* KM432Bz a été cultivée dans 2 l de milieu MRS à 30°C sans agitation jusqu'à la phase stationnaire de croissance pendant une nuit.

III.2. Purification de la bactériocine KM432Bz

III.2.1. Préparation et traitement du surnageant de culture

Les cultures bactériennes ont été centrifugées à 8000 g pendant 15 min à 4°C, le surnageant chauffé à 80°C pour dégrader les protéines/ peptides sensibles à la chaleur et le pH ajusté à 6,5 afin de neutraliser l'acide lactique produit par les bactéries lactiques. L'acide lactique possède des propriétés antibactériennes qui pourraient interférer avec celles de la bactériocine produite par la souche *Ln. pseudomesenteroides* KM432Bz.

III.2.2. Précipitation au sulfate d'ammonium et dialyse

Le surnageant a été précipité à 60% de saturation en sulfate d'ammonium (37,32 g de sulfate d'ammonium pour 100 ml de solution) à 4 °C puis centrifugé à 20000 g pendant 30 min à 4°C. Le culot a été repris dans 200 ml d'eau MilliQ® et dialysé pendant environ 20 h à l'aide de membranes de dialyse (*Spectra-Por®3*, MWCO 3,5 kDa) contre de l'eau MilliQ®. Une fois l'excès de sels éliminé, l'ensemble a été lyophilisé pendant la nuit et conservé à -20 °C.

III.2.3. Extraction en phase solide sur cartouche C_{18} (35cc)

Le lyophilisat du surnageant a été resuspendu dans 37,5 ml d'acétate d'ammonium 25 mM pH 6,5 et déposé sur une cartouche SepPak® C_{18} (*Waters Corp.*) préalablement régénérée avec 120 ml d'isopropanol 80% (v/v), lavée et équilibrée avec 200 ml d'acétate d'ammonium 25 mM pH 6,5. Des élutions ont été réalisées avec 20, 30, 40, 50 et 60% (v/v) d'isopropanol dans de l'acétate d'ammonium 25 mM pH 6,5. Afin d'identifier les fractions renfermant le peptide actif, les différentes fractions ont été testées sur la souche sensible *Lc. sakei* en utilisant la méthode des tests en milieu solide présentée dans le paragraphe I.4.1. Tout l'isopropanol présent dans les fractions a été évaporé des fractions actives à l'aide d'un évaporateur rotatif (*Laborota 4000, Heidolph*) puis les fractions ont été lyophilisées et conservées à -20 °C.

III.2.4. Purification par chromatographie liquide haute performance (C_{18} Inertsil ODS2)

Le lyophilisat a été repris par 250 µl d'un tampon d'acétate d'ammonium 25 mM pH 6,5 renfermant 10% (v/v) d'acétonitrile (ACN) puis purifié par chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase inverse C_{18} sur une colonne Inertsil ODS2 (*Interchim*, 5 µm, 250 mm x 4,6 mm) à l'aide d'une élution isocratique d'acide trifluoroacétique (TFA) 0,1% (v/v) dans H_2O 100% pendant 5 min puis d'un gradient d'acétonitrile (ACN) de 0 à 100% pendant 30 min avec un débit d'1 ml/min. Les différents pics ont été détectés à 226 nm sur une chaîne CLHP Ultimate 3000 (*Dionex*) et ont été récoltés manuellement et testés contre *Lc. sakei* suivant la méthode des tests en milieu solide présentée dans le paragraphe I.4.1 afin d'identifier le pic renfermant l'activité antibactérienne.

IV. Caractérisation de la bactériocine KM432Bz

IV.1. Dosage de la bactériocine KM432Bz

IV.1.1. Dosage de Bradford

C'est une méthode basée sur la formation d'un complexe entre les protéines ou peptides et un colorant : le bleu de Coomassie G-250 ou réactif de Bradford. En milieu acide, ce réactif, rouge/brun à l'état libre, prend une teinte bleue lorsqu'il est lié aux protéines/ peptides et plus particulièrement aux acides aminés basiques (principalement l'arginine) et présente par conséquent un coefficient d'extinction molaire élevé à 595 nm. Les fractions actives en sortie de CLHP ont été dosées à l'aide de cette méthode.

Le dosage de Bradford a été réalisé en suivant les instructions du kit « Coomassie Protein Assay Kit » (*Pierce*). Afin de réaliser une gamme étalon, le réactif de Bradford a été rajouté à une gamme de dilution de BSA (30 → 2,5 µg/ml). L'A_{595nm} de chaque échantillon a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Uvikon 9 x 3 (*Bioserv*). L'échantillon d'intérêt a subi le même traitement que la BSA et sa concentration a été déterminée en se référant à la gamme étalon de la BSA.

IV.1.2. Absorbance à 280 nm

Une mesure de l'absorbance de la fraction en sortie de CHLP renfermant la bactériocine KM432Bz a été effectuée à 280 nm après évaporation de l'ACN au Speedvac. La concentration de la bactériocine a été calculée suivant la loi de Beer Lambert : $\underline{A = l\ \varepsilon\ C}$, en utilisant le coefficient d'extinction molaire théorique 14105 $M^{-1}.cm^{-1}$ estimé à partir de la séquence en acides aminés (*http://www.expasy.org/cgi-bin/protparam*).

- A : absorbance.
- ε : le coefficient d'absorption molaire en M^{-1} cm^{-1}.
- l : la largeur de cuve en cm.
- C : la concentration de la solution en M.

IV.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS Tris-tricine (SDS-PAGE)

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS Tris-tricine (SDS-PAGE) permet la séparation des peptides et des protéines en fonction de leur masse moléculaire.

IV.2.1. Préparation du gel et des échantillons

La tricine possède une charge négative moins importante que la glycine ce qui lui confère une migration plus rapide en électrophorèse et permet donc la séparation de peptides (Schagger et von Jagow, 1987).

Deux fois 10 µl de la fraction en sortie de CLHP correspondant à la bactériocine pure ont été bouillis 5 min dans un mélange Laemmli/tampon de charge (Tris 80 mM, glycine 200 mM, SDS 0,1% (m/v), dithiothréitol (DTT) 40 mM, glycérol 7% (v/v), bleu de bromophénol 0,1%, pH 8,8) avant d'être chargés sur un gel de polyacrylamide SDS Tris-tricine. Un gel de séparation : acrylamide 16,5% (m/v), bis-acrylamide 0,5% (m/v), Tris 3 M, pH 8,45, 0,1% SDS (m/v) est surmonté d'un gel de concentration : acrylamide 3,8% (m/v) et bis-acrylamide 0,1% (m/v), Tris 3 M, SDS 0,07% (m/v), pH 8,45. La migration a été réalisée à 90 V pendant 1 h dans un tampon anode (Tris 0,2 M, pH 8,9) et un tampon cathode (Tris 0,1 M, tricine 0,1 M, SDS 0,1% (m/v), pH 8,25).

Trois marqueurs de poids moléculaire ont été utilisés : Polypeptide à raison de 40 µg/ puits (*Bio-Rad*), Broad Range Marker à raison de 20 µg/ puits (*NEB*) et Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder à raison de 10 µg/ puits (*Fermentas*). Les deux fractions CLHP correspondant à la bactériocine bouillie dans un mélange Laemmli/ tampon de charge ont été déposées sur le gel Tris tricine (20 µl/ puits). La migration a été réalisée à 60 V pendant 1 h à l'aide d'un générateur Pharmacia (*Fine Chemical*). A l'aide d'un scalpel, le gel a ensuite été délicatement séparé en deux parties dont l'une servira à la coloration au bleu de Coomassie et à l'argent et l'autre au test antimicrobien (gel overlay).

IV.2.2. Colorations

a. *Au bleu de Coomassie G-250* (principe présenté dans le paragragraphe IV.1.a)

Le gel a été incubé dans une solution de coloration (éthanol 40% (v/v), acide acétique 7% (v/v) et Bleu de Coomassie G-250 0,0025% (m/v)) sous agitation douce pendant la nuit puis rincé abondamment à l'eau MilliQ® avant d'être mis en contact avec une solution de décoloration (éthanol 40% (v/v), formaldéhyde 13,5% (v/v)) pendant 30 min. Le gel a ensuite été rincé à l'eau MilliQ® pour éliminer la solution de décoloration avant d'être coloré au nitrate d'argent dix à cent fois plus sensible que la technique de coloration au bleu de Coomassie G-250.

b. Au nitrate d'argent

La technique de coloration au nitrate d'argent repose sur la réduction, facilitée par la présence des protéines, de sels d'argent en argent métallique.

Le gel a été rincé directement à l'eau MilliQ®, s'il a été préalablement soumis à la coloration au bleu de Coomassie G-250, sinon directement incubé dans une solution de fixation (méthanol 40% (v/v), formaldéhyde 13,5% (v/v)) pendant 10 min avant d'être rincé à l'eau MilliQ® 2 fois 5 min. Le gel a ensuite été incubé 1 min dans du thiosulfate de sodium 0,02% (m/v) puis rincé à l'eau MilliQ® avant d'être incubé dans une solution de nitrate d'argent 0,1% (m/v) puis rincé à nouveau à l'eau MilliQ®. Puis, le gel a été traité par une solution de développement (Na_2CO_3 3% (m/v), $Na_2S_2O_3$ 0,0004% (m/v) et formaldéhyde 0,05% (m/v). Enfin, le gel a été incubé dans 30 ml de solution de développement en présence d'un agent fixateur de coloration, le formaldéhyde à 15% jusqu'à l'apparition de bandes d'intensité adéquate puis la réaction de révélation a été arrêtée par addition d'1,5 ml d'acide citrique 2,3 M. Après révélation des bandes protéiques, le gel a été incubé 10 min dans la solution avant d'être rincé à l'eau. Les gels colorés ont été incubés dans une solution de séchage (10% éthanol (v/v), 4% glycérol (v/v)) pendant 10 min et séchés entre deux feuilles de cellophane, préalablement immergées dans la solution de séchage, pendant 48 à 72 h.

IV.2.3. Détection d'activité antibactérienne sur gel (gel overlay)

Afin de visualiser la bande protéique correspondant à la bactériocine, la partie de gel qui n'a pas été colorée est soumise à un test antibactérien avec la souche *Li. monocytogenes*.

La partie du gel qui n'a pas été colorée a été traitée pendant une nuit par une solution de fixation (isopropanol 15% (v/v) et acide acétique 10% (v/v)) puis lavée 4 h à l'eau MilliQ® et enfin rincée à l'eau distillée stérile. Le gel a ensuite été déposé sur 3 ml de gélose molle de BHI (**Tableau M. 1**) préalablement coulée dans une boîte de pétri. L'ensemble a été recouvert par 5 ml de gélose molle de BHI contenant 0,5% (v/v) de la culture bactérienne de *Li. monocytogenes* à A_{260nm}=0,2 et incubé pendant une nuit.

IV.3. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse consiste à déterminer la masse moléculaire précise des peptides et des protéines en produisant des ions à l'état gazeux à partir d'un échantillon donné. La masse moléculaire de l'échantillon analysé est ensuite mesurée à partir du rapport masse/charge (*m/z*).

Dans mon étude, j'ai utilisé deux techniques : MALDI-TOF-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight- Mass Spectrometry) et la spectrométrie de masse en mode ESI (ElectroSpray Ionisation) et en mode tandem MS-MS. Les analyses de la pureté et la masse de la bactériocine ont été réalisées par MALDI-TOF-MS et le séquençage des peptides par MS-MS à l'aide d'un appareil ESI-Qq-TOF (Electrospray Ionisation-Quadripole-Time of Flight) (*Applied Biosystems*).

IV.3.1. MALDI-TOF

En spectrométrie de masse MALDI-TOF, la molécule mélangée à une matrice est ionisée par un laser conduisant ainsi à la désorption d'un mélange matrice et molécules d'intérêt ionisées. Par sa position dans le prolongement de la source, l'analyseur TOF peut fonctionner en mode linéaire ou en mode réflectron. Seule l'analyse en mode linéaire a été réalisée au cours de notre étude.

La bactériocine a été analysée sur spectromètre de masse MALDI-TOF Voyager-DE-PRO (*Applied Biosystems*). Les échantillons ont été co-cristallisés avec une matrice d'acide α-cyano-4-hydroxycinamique selon la méthode sandwich. Pour cela, un volume de 0,5 µl de matrice dans l'acétone a été déposé sur la plaque. Après séchage, 1 µl d'échantillon puis 1 µl de matrice contenue dans une solution d'ACN à 70% dans de l'acide formique (AF) à 0,1%, ont été déposés sur la plaque. L'échantillon a été ionisé puis accéléré avec une tension de 20 000 V. Les mesures ont été réalisées en mode linéaire avec une détection des ions en mode positif et un temps de latence de 150 ns sous 100 acquisitions.

IV.3.2. ESI-qTOF

La spectrométrie de masse en mode MS-MS réalisée avec une source électrospray permet d'obtenir des informations sur la séquence des peptides et consiste en la désolvatation d'ions générés sous l'influence d'un champ électrique intense appliqué à la surface d'un liquide et à pression atmosphérique.

L'échantillon en solution a été introduit dans la source par infusion directe à l'aide d'une pompe à seringue. Un couplage à une CLHP permet de séparer préalablement les différentes molécules de l'échantillon. Il a été introduit avec un faible débit (1 à 10 µl.min^{-1}) dans un capillaire qui a été porté à un haut potentiel électrique. Afin de déterminer la masse moléculaire précise de la bactériocine KM432Bz et d'obtenir les éléments de séquence, la fraction en sortie de CLHP correspondant à la bactériocine native a été analysée par LC-MS

sur un appareil qQ-TOF, QSTAR Pulsar (*Applied Biosystems*) équipé d'une source nanospray (nano-ESI) en mode positif.

IV.4. Détermination de la séquence peptidique

IV.4.1. Réduction et alkylation

La réaction de réduction a été réalisée afin de réduire les ponts disulfures formés par des cystéines qui pourraient empêcher l'hydrolyse enzymatique et ainsi le séquençage peptidique de la bactériocine. La réaction d'alkylation qui suit empêche la reformation des ponts disulfures réduits précédemment. L'ACN et le TFA ont été éliminés de la fraction CLHP renfermant la bactériocine KM432Bz à 20 µM par évaporation au Speedvac®. 50 µl de l'échantillon renfermant la bactériocine a ensuite été ajouté à de l'EDTA 2 mM, chlorure de guanidium 6 M et DTT 4 M, dans du tampon Tris-HCl 0,5 M, pH 7,5 puis dégazé à l'azote avant d'être incubé à 45°C pendant 1 h. Le mélange réactionnel a ensuite été incubé à 45°C pendant 10 min après addition de 2 µl de 4-vinylpyridine (970 µg/ml final).

IV.4.2. Digestions enzymatiques

50 µl de la bactériocine réduite et alkylée à 20 µM ont été ajoutés à 50 µl de tampon NH_4HCO_3 50 mM, pH 8 contenant 20 ng/µl de trypsine bovine (*Sigma*) ou d'endoprotéinase GluC (*Roche*) et incubés à 37°C pour la trypsine ou à 25°C pour la GluC pendant la nuit. Les mélanges réactionnels ont été dessalés sur ZipTip C18 (*Omix, Varian*) avant analyse par spectrométrie de masse.

IV.4.3. Séquençage par dégradation d'Edman

Cette technique permet de séquencer les peptides ou protéines en identifiant le résidu *N*-terminal à chaque cycle. La fonction amine de l'acide aminé en position N-terminale de la chaîne peptidique est d'abord traitée à pH alcalin par le phénylisothiocyanate (PITC), appelé aussi réactif d'Edman. Le dérivé phénylthiocarbamyle (PTC) de la protéine ou du peptide ainsi obtenu est traité par un acide anhydre qui permet le clivage de la liaison peptidique du premier acide aminé en position *N*-terminale.

Après réarrangement du dérivé anilinothiazolinone, acide aminé instable, en phénylthiohydantoïne-acide aminé (PTH-Aa), ce dérivé a été identifié par CLHP. La dégradation s'est poursuivie en répétant plusieurs fois ce cycle de réactions.

Le séquençage a été réalisé par M. Jacques D'Alayer sur la plate-forme d'analyse et de microséquençage de l'Institut Pasteur.

a. Purification du peptide réduit et alkylé par CLHP

La bactériocine réduite et alkylée a été clivée par la trypsine et injectée sur colonne en ligne de DEAE (35 x 1,5 mm) - C_{18} (150 x 1,5mm). Un lavage de 30 min a ensuite été réalisé par une solution contenant de l'ACN 2% dans du TFA aqueux à 0,1% afin d'éliminer le DTT utilisé lors de la réduction. Le peptide a ensuite été purifié en utilisant un gradient de 2 à 70% d'ACN dans 0,1% de TFA aqueux avec un débit de 60 µl/min.
Puis, le peptide a été transféré soit sur fibre de verre Biobrene soit sur membrane ProSorb (PVDF), deux supports qui retiennent le peptide.

b. Dégradation d'Edman

Le peptide immobilisé a été soumis à la dégradation d'Edman à l'aide d'un séquenceur Procise 492 (*Applied Biosystems*) et les acides aminés identifiés en CLHP.

IV.4.4. Séquençage par spectrométrie de masse (LC-MS/MS)

La fragmentation a été réalisée par un transfert d'énergie supplémentaire qui permet de rompre les liaisons covalentes. Dans le spectromètre utilisé lors de cette étude, ce transfert d'énergie a été la dissociation induite par collision (CID). L'ion à fragmenter est entré en collision avec les atomes d'un gaz non chargé. Ces collisions ont augmenté l'énergie interne des ions pour les activer et provoquer leur décomposition. Les rapports *m/z* des fragments produits ont été alors analysés.
Les fragments générés lors de la digestion à la trypsine ou l'endoprotéinase GluC ont été analysés par micro-CLHP-MS-MS (chaîne Ultimate 3000 *Dionex* U3000, Q-STAR Pulsar Qq-TOF). La séparation a été effectuée sur une colonne Zorbax 300 SB C_8 (300 Å, 3,5 µm, 150 mm x 1 mm, *Agilent*) avec un gradient allant de 0 à 60% d'ACN dans 0,1% d'acide formique pendant 20 min avec un débit de 40 µl/min. Les expɪiences de dissociations induites par collisions ont ɪtɪ ɾɑlisɪes sur le fragment *C*-terminal avec une énergie de collision de 100 eV.

Caractérisation d'une bactériocine produite par une souche de Leuconostoc pseudomesenteroides *isolée du boza*

La boza ou buza, signifiant céréales en persan, est une boisson traditionnelle fermentée (**Figure II. 1a**) consommée en Turquie et dans la région des Balkans (**Figure II. 1b**). De consistance épaisse, le boza est sucré, acidulé et peu alcoolisé. La recette de cette boisson diffère en fonction des régions. Ainsi, le boza est préparé à partir de germes de blé en Albanie, de blé fermenté en Turquie et de blé et/ ou de céréales en Bulgarie et en Roumanie.



Figure II. 1°. Le boza.
(*http://www.recipeturk.com/viewing-recipe-1-228/desserts/boza.html*).



Figure II. 1b. La région des Balkans.
(http://*www.ladocumentationfrancaise.fr/dossiers/europe-balkans/carte-balkans-union-europeenne.shtml*).

Le boza a été fabriqué la première fois par les Turcs d'Asie centrale au X^{e} siècle. Plus tard, il a été importé dans les Balkans et le Caucase par l'empire Ottoman. Cette boisson était consommée librement dans ces régions jusqu'au XVII^{e} siècle lorsqu'elle a été interdite par le Sultan Mehmed IV et remplacée par un nouveau type de boisson non alcoolisée, plus sucrée, consommée habituellement en Albanie. Malgré son interdiction dans la région, le boza a continué à être consommé en particulier par les soldats qui lui attribuaient des qualités énergisantes. Depuis, les habitants des Balkans lui ont conféré de nombreuses propriétés telles que la régulation de la pression artérielle, l'augmentation de la lactation chez la femme, l'amélioration de la digestion ainsi que la bioconservation *(http://www.pacaraboza.com/eng/boza.php)*.

Par ses nombreuses vertus et sa popularité, le boza a suscité l'intérêt de nombreux chercheurs. Il a été montré que cette boisson renfermait différents microorganismes responsables de la fermentation parmi lesquels les genres bactériens *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* ainsi que des levures du genre *Saccharomyces* (Gotcheva *et al.*, 2000, Hancioğlu et Karapinar, 1997, Kabadjova *et al.*, 2000, Zorba *et al.*,

2003). Ensuite, il a été rapporté que parmi ces bactéries, certaines comme *Lb. fermentum*, *Lb. lactis*, *Lb. plantarum* et *Ln. mesenteroides* étaient productrices de bactériocines et porteuses de propriétés probiotiques à l'origine d'une partie de la bonne conservation du boza (Todorov et Dicks, 2004, Todorov et Dicks, 2005a, Todorov *et al.*, 2006c, von Mollendorff *et al.*, 2006) (**Tableau II. 1**).

Tableau II. 1. Bactéries productrices de bactériocines isolées du boza.

Bactérie	**Bactériocine**	**Référence**
*Enterococcus faecium*ST62BZ	ST62BZ	(Todorov, 2010)
Lactobacillus fermentum JW11BZ	ND	(von Mollendorff *et al.*, 2006)
Lactobacillus fermentum JW15BZ	ND	(von Mollendorff *et al.*, 2006)
Lactobacillus paracasei ST242BZ	ST242BZ	(Todorov *et al.*, 2006c)
Lactobacillus paracasei ST284BZ	ST284BZ	(Todorov et Dicks, 2006d)
Lactobacillus pentosus ST712BZ	ST712BZ	(Todorov et Dicks, 2006d)
Lactobacillus plantarum JW3BZ	ND	(von Mollendorff *et al.*, 2006)
Lactobacillus plantarum JW6BZ	ND	(von Mollendorff *et al.*, 2006)
Lactobacillus plantarum ST194BZ	ST194BZ	(Todorov et Dicks, 2006d)
Lactobacillus plantarum ST414BZ	ST414BZ	(Todorov et Dicks, 2006d)
Lactobacillus plantarum ST69BZ	ST69BZ	(Todorov, 2010)
Lactobacillus plantarum ST664BZ	ST664BZ	Todorov S.D., Dicks L.M.T., 2006
Lactobacillus rhamnosus ST461BZ	ST461BZ	Todorov S.D., Dicks L.M.T., 2006
Lactobacillus rhamnosus ST462BZ	ST462BZ	Todorov S.D., Dicks L.M.T., 2006
Lactococcus lactis ST63BZ	ST63BZ	(Todorov, 2010)
Lactococcus lactis ST611BZ	ST611BZ	(Todorov, 2010)
Lactococcus lactis ST612BZ	ST612BZ	(Todorov, 2010)
Lactococcus lactis subsp. *lactis* BZ	Lactococcine BZ	(Şahingil *et al.*, 2009)
Lactococcus lactis subsp. *lactis* B14	Bozacine 14	(Kabadjova *et al.*, 2000)
Leuconostoc mesenteroides subsp. *dextranicum* ST99	Mésentéricine ST99	(Todorov et Dicks, 2004)
Pediococcus pentosaceus ST18	Pédiocine ST18	(Todorov et Dicks, 2005b)

ND : Non Déterminé.

Les bactériocines produites par ces bactéries présentent une activité antimicrobienne dirigée contre des pathogènes responsables d'infections parmi eux, *E. faecalis*, *Li. monocytogenes*,… (Todorov et Dicks, 2004, von Mollendorff *et al.*, 2006)). Enfin, la propriété de bioconservation ainsi que les bienfaits du boza pourraient encourager sa consommation dans certains pays où des épidémies d'infections causées par une mauvaise conservation des denrées alimentaires sont récurrentes.

Parmi les bactéries retrouvées dans le boza, les genres *Lactobacillus* et *Leuconostoc* sont les plus répandus (Hancioğlu et Karapinar, 1997). Le genre *Leuconostoc* regroupe des bactéries lactiques à Gram positif hétérofermentaires, anaérobies facultatives et dépourvues de catalase (Gravie *et al.*, 1986). Il renferme, par ailleurs, différentes espèces bactériennes parmi lesquelles *Leuconostoc carnosum* (*Ln. carnosum*), *Leuconostoc citreum* (*Ln. citreum*), *Leuconostoc durionis*, *Leuconostoc fallax*, *Leuconostoc gelidum* (*Ln. gelidum*), *Ln. mesenteroides*,… (Euzeby, 1997) présentes le plus souvent en association avec des végétaux et dans la viande mais aussi dans le lait et les produits laitiers (Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004). Ces bactéries participent à la préparation de nombreux produits alimentaires fermentés en optimisant leur goût et leur texture (Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004, Steinkraus, 2002) ainsi qu'à leur bioconservation (Ogier *et al.*, 2008, Steinkraus, 2002, Trias *et al.*, 2008). La bioconservation des aliments par ces bactéries se fait principalement à travers l'acidification du milieu et la production de bactériocines (Héchard *et al.*, 1999, Mathieu *et al.*, 1993, Steinkraus, 2002) (*voir chapitre I V. Les applications des bactériocines*).

L'effet antimicrobien dû aux bactériocines produites par *Leuconostoc* sp. a été observé pour la première fois dans les années 90 (Ahn et Stiles, 1990). Plus tard, différentes bactériocines produites par *Leuconostoc* sp. ont été isolées (**Tableau II. 2**) parmi lesquelles quelques unes ont été caractérisées (**Figure II. 2**).

Parmi ces bactériocines, la leucocine A-UAL 187, produite par *Ln. gelidum* A-UAL 187 (Hastings *et al.*, 1991), la leucocine B-Ta11a produite par *Ln. carnosum* Ta11a (Felix *et al.*, 1994), la mésentéricine Y105 produite par *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* Y105 (Héchard *et al.*, 1992),… (**Figure II. 2**). Depuis, de nouvelles bactériocines ont été et sont toujours découvertes (Sawa *et al.*, 2010). La détermination des séquences peptidiques des bactériocines produites par *Leuconostoc* sp. a permis de montrer qu'elles faisaient partie de la classe II et présentaient, par conséquent, une activité antimicrobienne dirigée contre des bactéries pathogènes incluant en particulier *Listeria* sp. (Stiles, 1994) (**Figure II. 2**). Ceci pourrait peut-être aussi être le cas de bactériocines isolées de bactéries du genre *Leuconostoc* mais pas encore caractérisées comme la kimchicine par exemple (Chang *et al.*, 2007).

Bactériocine	Bactérie productrice	Classe	Origine	Référence
Leucocine 4010 (A et B)	*Leuconostoc carnosum* 4010	IIa	Viande	(Budde *et al.*, 2003)
Leucocine A-UAL 187*	*Leuconostoc gelidum* A-UAL 187	IIa	Viande	(Hastings *et al.*, 1991)
Leucocine B-Ta11a*	*Leuconostoc carnosum* Ta11a	IIa	Viande	(Felix *et al.*, 1994)
Leucocine A-TA33a*	*Leuconostoc mesenteroides* TA33a	IIa	Viande	(Papathanasopoulos *et al.*, 1998)
Leucocine B-TA33a*	*Leuconostoc mesenteroides* TA33a	IIa	Viande	
Leucocine C(-TA33a)[2*]	*Leuconostoc mesenteroides* TA33a	IIa	Viande	(Fimland *et al.*, 2002a)
Leucocine A (ΔC7)*	*Leuconostoc pseudomesenteroides* QU15	IIa	Riz	(Sawa *et al.*, 2010)
Leucocine A-QU15*	*Leuconostoc pseudomesenteroides* QU15	IIa	Riz	
Leucocine Q*	*Leuconostoc pseudomesenteroides* QU15	IId	Riz	
Leucocine N*	*Leuconostoc pseudomesenteroides* QU15	IId	Riz	
Leucocine H (α et β)	*Leuconostoc* MF215B	IIb	ND	(Blom *et al.*, 1999)
Leuconocine J	*Leuconostoc* sp. J2	ND	Kimchi[1]	(Choi *et al.*, 1999)
Kimchicine GJ7	*Leuconostoc citreum* GJ7	?	Kimchi	(Chang *et al.*, 2007)
Mésentérocine 52A	*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52	IId	Lait	(Revol-Junelles *et al.*, 1996)
Mésentérocine 52B	*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52	IId	Lait	
Mésentéricine ST99	*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* ST99	ND	Boza	(Todorov et Dicks, 2004)
Mésentéricine Y105*	*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* Y105	IIa	Lait fermenté	(Héchard *et al.*, 1992)
Mésentéricine B105*	*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* Y105	IIa	Lait fermenté	(Héchard *et al.*, 1999)

Tableau II. 2. Bactériocines produites par des bactéries du genre *Leuconostoc*.

[1] : Le kimchi est un plat traditionnel Coréen préparé à partir de végétaux fermentés (chou chinois, radis, ail, piment rouge, oignon). [2] : La séquence peptidique de la leucocine C-TA33a a été partiellement déterminée par Papathanasopoulos M. A. *et al.* (Papathanasopoulos *et al.*, 1998) puis complétée par Fimland G. *et al.* (Fimland *et al.*, 2002a) et appelée leucocine C. * Bactériocines dont la séquence peptidique a été déterminée (**Figure II. 2**).



Figure II. 2. Alignement de séquences peptidiques des bactériocines produites par *Leuconostoc* sp.

Sont surlignés en rouge, les acides aminés conservés à 80-100 % ; en bleu les acides aminés conservés à 60-80 % ; en gris, les acides aminés conservés à 40-50 % ; en vert les acides aminés conservés à 20-30 % et en violet les acides aminés conservés entre deux bactériocines. La séquence peptidique spécifique au précurseur de la bactériocine est représentée en italique, les séquences des précurseurs de bactériocines manquantes indiquent que le gène codant la bactériocine n'a toujours pas été identifié. Le site de clivage (motif GG) est représenté en violet.

▸ : Site de clivage.

En se basant sur les homologies de séquences observées (**Figure II. 2**) nous pouvons constater que les bactériocines produites par *Leuconostoc* appartiennent à deux classes (classe IIa ou classe IId). Les leucocines A (UAL-187 et TA33a) et les leucocines B-Ta11a et A-QU15 ont la même séquence en acides aminés et ne diffèrent que par la séquence de la région leader de leurs précurseurs. Les séquences en acides aminés des leucocines A et B sont homologues à 95% à celle de la mésentéricine Y105 et s'en distinguent seulement par la région leader du précurseur et deux acides aminés de la bactériocine proprement dite. La leucocine C (-TA33a) se différencie des leucocines de classe IIa par la séquence de sa région *C*-terminale. En se basant sur les homologies de séquences, deux sous-groupes se dessinent à l'intérieur des bactériocines de classe IId produites par des *Leuconostoc*. D'une part les leucocines Q et N et d'autre part la mésentéricine B105 et la leucocine B-TA33a. Les fortes homologies de séquences peptidiques entre les bactériocines produites par *Leuconostoc* sp. suggèrent la possibilité d'un transfert génétique horizontal des clusters de gènes impliqués dans la biosynthèse des bactériocines entre bactéries du même genre.

Il a été montré que les bactéries du genre *Leuconostoc* renfermaient un ou plusieurs plasmides de différentes tailles (Dessart et Steenson, 1995). Ces plasmides portent différents systèmes génétiques parmi lesquels celui impliqué dans la biosynthèse des bactériocines (Dessart et Steenson, 1995, Fremaux *et al.*, 1995). Le transfert horizontal chez *Leuconostoc*

sp. s'avère être un phénomène courant. Ainsi, des séquences d'insertion (« Inversed Sequences », I.S.) ont été identifiées et analysées par Johansen et Kibenich (Johansen et Kibenich, 1992) chez des bactéries appartenant au genre *Leuconostoc*, suggérant ainsi la possibilité d'un échange génétique entre les différentes espèces bactériennes.

Dans notre étude, nous avons isolé et identifié une souche provenant du boza productrice de bactériocine. Après analyse structurale de la bactériocine et de son cluster de gènes, nous avons montré que cette bactériocine est identique aux leucocines B et A-QU15 produites respectivement par *Ln. carnosum* et *Ln. pseudomesenteroides*.

I. Publication

(En cours de soumission dans **Food Microbiology**).

Original research paper

Characterization of a bacteriocin produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolated from boza

Kahina M. Makhloufi[a], Alyssa Carré-Mlouka[a], Jean Peduzzi[a], Carine Lombard[a], Carol A. van Reenen[b], Svetoslav T. Todorov[b,c], Leon M.T. Dicks[b], Sylvie Rebuffat[a]

[a]*Molécules de Communication et Adaptation des Microorganismes (MCAM), UMR 7245 CNRS-MNHN, Muséum National d'Histoire Naturelle, CP 54, 57 rue Cuvier, 75005 Paris, France*

[b]*Department of Microbiology, University of Stellenbosch, 7600 Stellenbosch, South Africa*

[c]*Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Av. Prof. Lineu Prestes 580, Bloco 14, 05508-000 São Paulo e SP, Brazil*

Corresponding author:

Sylvie Rebuffat : Molécules de Communication et Adaptation des Microorganismes (MCAM), UMR 7245 CNRS-MNHN, Muséum National d'Histoire Naturelle, CP 54, 57 rue Cuvier, 75005 Paris, France

e-mail : rebuffat@mnhn.fr

Tel: +33 140793118

Fax: +33 140793135

ABSTRACT

Many food-grade microorganisms are used to produce a variety of fermented food, among which lactic acid bacteria (LAB). LAB inhibit food spoilage bacteria by producing lactic acid and growth-inhibiting peptides termed bacteriocins. Bacteriocins are antimicrobial peptides that are ribosomally synthesized and usually active against related species. Boza is a fermented beverage from the Balkans prepared from cereals. Many LAB producing antimicrobial compounds have been isolated from this beverage, such as *Leuconostoc*, which produces peptides active against *Listeria*, a pathogen responsible for animal and human diseases. We here isolated a bacteriocin-producing bacterium from boza that we identified as *Leuconostoc pseudomesenteroides* KM432Bz. The primary structure of the 3930 Da peptide revealed that this antimicrobial peptide is similar to leucocin A/B and belongs to class IIa bacteriocins. The plasmid-located gene cluster encoding a precursor, an immunity protein, an ATP-dependent transporter and an accessory factor involved in the bacteriocin biosynthesis was identified and analysed. Leucocin KM432Bz inhibits the growth of related species as well as pathogens like *Listeria*, *Enterococcus* and *Streptococcus* species with minimal inhibitory concentrations included in the 0.75-2.5 µM range. Antimicrobial assay on mutated σ^{54} *Listeria monocytogenes* was performed using leucocin KM432Bz, in order to confirm that σ^{54} is required for its mode of action.

Keywords: boza, antimicrobial peptide, lactic acid bacteria, leucocin KM432Bz, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, biosynthesis gene cluster.

Highlights

> An active strain has been isolated from boza and identified as a *Leuconostoc pseudomesenteroides* called KM432Bz. > The amino sequence of the isolated active peptide is identical to those of leucocins A and B. > The gene encoding the precursor of leucocin KM432Bz is identical to that of leucocin B. > Leucocin KM432Bz inhibits the growth of pathogens such as *Listeria, Enteroccus and Streptococcus*. > Like other classs IIa bacteriocins, leucocin KM432Bz requires σ^{54} for its mode of action.

1. Introduction

Boza is a traditional popular fermented beverage widely consumed in the Balkan region. It is produced from fermented cereals, such as maize, wheat or millet, with lactic acid bacteria of the genera *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* and *Pediococcus* (Gotcheva et al., 2000, Hancioğlu et al., 1997, Kabadjova et al., 2000). Because of its popularity, a number of studies have been conducted on boza and many lactic acid bacteria have been isolated and described (Kabadjova et al., 2000, Todorov et al., 2004b, von Mollendorff et al., 2006). In one study, as many as 33 strains isolated from boza showed antibacterial activity against various Gram-positive bacteria, including the food pathogens *Listeria innocua*, and Gram-negative bacteria such as *Escherichia coli* (Kabadjova et al., 2000). Another study reports the probiotic properties of eight strains isolated from boza, including survival in conditions simulating the gastrointestinal tract and production of antibacterial and antiviral compounds (Todorov et al., 2008).

Bacteriocins are defined as ribosomally synthesized antimicrobial peptides produced by bacteria (Cotter et al., 2005, Tagg et al., 1976) and exhibiting an antagonism against phylogenetically-related species (Jack et al., 1995). Bacteriocins have been isolated from different food matrices such as fermented products, vegetables, fruits, meat and fish, and have been mostly studied among lactic acid bacteria. Potential biotechnological applications of bacteriocins produced by lactic acid bacteria include their use as natural food preservatives (Abee et al., 1995, Settanni et al., 2008, Stiles, 1996). Bacteriocins may be divided into two main classes based on genetic and biochemical characteristics (Cotter et al., 2005). Class I consists of the lanthionine-containing post-translationally modified bacteriocins (Chatterjee et al., 2005, Jack et al., 1995). Class II commonly called “pediocin-like bacteriocins” includes unmodified non-lanthionine-containing bacteriocins, which are subdivided into four subclasses namely, class IIa (pediocin-like bacteriocins), class IIb (two-peptide bacteriocins), class IIc (circular bacteriocins) and class IId (miscellaneous bacteriocins) (Cotter et al., 2005, Drider et al., 2006). The gene clusters encoding bacteriocin synthesis generally include a structural gene, gene(s) involved in immunity of the producing strain, gene(s) encoding transport proteins and gene(s) necessary to the regulation of the production (Ennahar et al., 2000, Klaenhammer, 1993).

A total of fifteen bacteriocins have been detected in lactic acid bacteria from boza so far, but only a few have been characterized (von Mollendorff et al., 2006). Bacteriocin B14

produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 14 was the first reported bacteriocin from boza (Kabadjova et al., 2000). Mesentericin ST99, produced by *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum*, was shown to be a heat- and acid-stable single peptide with bacteriostatic activity on *Li. innocua* (Todorov et al., 2004a). Other bacteriocins, produced by strains of *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus pentosus* have been reported from boza. In most cases, the spectrum of activity, the sensitivity to physico-chemical conditions (temperature, pH), and the production kinetics have been determined, together with the preliminary purification of the bacteriocins. The molecular masses of the bacteriocins from boza range from 2.8 to 14 kDa, but the amino acid sequences, genetic clusters or modes of action were determined for none of them (von Mollendorff et al., 2006).

This study focuses on a bacteriocin produced by a strain isolated from boza that we identified as *Ln. pseudomesenteroides* and called KM432Bz. We describe the purification and identification of the bacteriocin and have determined its spectrum of activity, as well as the gene cluster involved in the bacteriocin production. We also compare the properties of leucocin KM432Bz to those of pediocin, a commercialized class IIa bacteriocin used a food microbial control agent. This is the first report of a thorough characterization of a bacteriocin from boza, which presents a good potential as a food preservative to prevent proliferation of *Li. monocytogenes*.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and plasmids

Escherichia coli DH5α was provided by A.-M. Pons (Université de la Rochelle, France). *E. coli* strains were cultivated in LB medium at 37°C. Strain *Ln. pseudomesenteroides* KM432Bz from boza was provided by Leon Dicks (Stellenbosch University, South Africa). *Li. monocytogenes* EGDe *rpoN*$^{-}$ was kindly given by Yann Héchard (Université de Poitiers, France). Table 1 lists all the other bacterial strains used in this study, and their culture conditions. Unless otherwise mentioned, all strains were obtained from the Institut Pasteur CRBIP (Paris). The plasmid used in this study was pGEM®-T Easy Vector (Promega).
Lactic acid bacteria were cultivated without agitation (Table 1).

2.2. Antibacterial assays

2.2.1. Radial diffusion assays

The indicator strain was cultivated for 2 h in 10 mL (growth conditions are presented in Table 1). When the absorbance at 260 nm (A_{260}) reached 0.2, the bacterial growth was stopped by incubation on ice. Melted soft agar (6.5 g/L agar) was inoculated with 10^7 CFU/mL of this culture, and poured over Petri dishes. Five µl of the producing strain or 10 µM leucocin KM432Bz was spotted over the agar, and the plates were incubated for 16 h at different growth temperatures, according to the indicator strain (Table 1). All the tests were repeated three times. Diameters of the inhibition zones were measured.

2.3.2. Determination of minimal inhibitory concentrations (MICs)

The bacteriocin concentrations were calculated spectrometrically according to the absorbance at 280 nm (using the theoritical molar extinction coefficient 14105 $M^{-1}.cm^{-1}$ estimated referring to the acid amino sequence (*http://www.expasy.org/cgi-bin/protparam*)). Microtiter plate wells were inoculated with 90 µL of sensitive bacteria at a concentration of 10^5 CFU/mL for all strains, except for *Listeria* strains for which a concentration of 5.10^4 CFU/mL was used. Ten µL of purified leucocin KM432Bz or of commercial pediocin (P0098, Sigma) were added at different final concentrations (10, 5, 2.5, 1.25 µM, 625, 312,

156, 78 and 39 nM). The different dilutions were obtained using 25 mM ammonium acetate buffer, pH 6.5. The plates were incubated for 13-18 h at 30 °C. The A_{620} was measured using a Multiskan FC reader (Thermo Scientific).

2.3. Bacterial growth in and leucocin KM432Bz production

The effects of 10 µL of 10 µM leucocin KM432Bz on the growth of strains *Li. monocytogenes* CIP 80110 and *Lactobacillus. sakei* subsp. *sakei* CIP 103139 were observed by following A_{620} of 100 mL cultures for 35 h.

Production kinetics of leucocin KM432Bz were performed. Growth of the producing strain *Ln. pseudomesenteroides* KM432Bz was monitored by following A_{620} of a 100 ml culture for 24 h. Two mL of culture were collected at 2 h-intervals and centrifugated at 8,000 x g for 10 min at 4 °C. One mL of the resulting supernatant was heated at 80 °C for 10 min. The pH was monitored and adjusted to 6.5 using 1 M NaOH. Radial diffusion assays were then performed as described above.

2.4. Bacteriocin purification

The producing strain KM432Bz was cultivated in 2 L of MRS broth at 30 °C overnight without agitation. Culture supernatants were separated from bacterial cells by centrifugation at 8,000 x g for 15 min at 4 °C and heated at 80 °C for 10 min. The pH was adjusted to 6.5 using 1 M NaOH. Proteins were precipitated by addition of 60% ammonium sulphate. After centrifugation at 25,000 x g for 30 min at 4 °C, the pellet was dissolved in 200 mL of Milli-Q® water, and dialysed against Milli-Q® water using Spectra-Por®3, MWCO 3.5 kDa at 4°C for 20 h under gentle agitation. The treated supernatant (37 mL) was subjected to solid-phase extraction on a Sep-Pak C18 cartridge (35 cc, 10 g, Waters Corp.). The column had been previously regenerated with 80% (v/v) isopropanol in 25 mM ammonium acetate buffer pH 6.5, and washed with 200 mL of 25 mM ammonium acetate buffer pH 6.5. Elutions with 250 mL (v/v) of 20, 30, 40, 50 and 60% isopropanol in ammonium 25 mM acetate buffer pH 6.5 were performed. The bacteriocin containing fractions (50 mL) were identified by performing the radial diffusion assays described previously, using 5 µL of each fraction. Active fractions were lyophilized and purified by reversed phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) on an Inertsil ODS2 column (5 µm, 4.6 x 250 mm/ Interchim, France). Separations were performed using a

gradient of 0% to 100% acetonitrile (ACN) in 0.1% aqueous TFA for 30 min at a flow rate of 1 mL/min. Fractions were monitored by following OD at 226 nm.

2.5. Tricine-SDS polyacrylamide gel electrophoresis

Five µL of the purified bacteriocin was performed on a sodium dodecyl sulfate (SDS)-tricine 16.5% (v/v) polyacrylamide gel (Schagger et al., 1987) using an anode buffer (Tris 0,2 M, pH 8,9) and a cathode buffer (Tris 0,1 M, tricine 0,1 M, SDS 0,1% (m/v), pH 8,25) and a vertical slab apparatus at a constant voltage (60 V) for 1 h. The tricine-SDS-PAGE gel containing the active sample was overlaid with Brain Heart Infusion (BHI) soft agar inoculated with 10^6 CFU/mL of *Li. monocytogenes*, as described previously by Zhu *et al.* (2000).

2.6. Enzymatic digestions

Purified peptide were subjected to reduction and alkylation using the procedures already described (Bulet et al., 1992). Purified leucocin KM432Bz at 20 µM was dissolved in 40 µL of 0.5 M Tris HCl containing 2 mM EDTA and 6 M guanidine hydrochloride, pH 7.5, to which 2 µL of 2.2 M dithiotreitol were added. The samples were incubated under oxygen-free conditions for 1 h at 45°C. 2 µL of freshly distilled 4-vinylpyridine at a final concentration of 970 µg/ml (Sigma) were added, and incubation was continued for 10 min at 45°C under N_2 to prevent oxidation. The reaction was stopped by speedvac evaporation.

Native peptide was subjected individually to GluC endoproteinase (Roche) and trypsin (Sigma) treatments. GluC endoproteinase and Trypsin hydrolysis were performed at an enzyme/substrate ratio of 1:100 (w/w) in a 100-µL reaction containing 50 mM and 25 mM NH_4HCO_3 at pH 8 incubated for 16 h at 25 and 37 °C respectively. The reactions were stopped by acidification with 0.1% formic acid and were desalted on Zip-Tip C18 (Omix, Varian) before ESI-MS analysis

2.6. Mass spectrometry

2.6.1. MALDI-TOF-MS

Leucocin KM432Bz-containing fractions were analyzed by matrix-assisted laser desorption ionization–time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) on a Voyager-De-Pro MALDI-TOF mass spectrometer (Applied Biosystems) operated in linear positive mode, using α-cyano-4-hydroxycinnamic acid as the matrix. The purity and molecular mass of commercial pediocin (P0098, Sigma) were assessed using similar conditions.

2.6.2. LC-MS-MS

ESI-MS analyses and MS-MS using nanoelectrospray mass spectrometry were carried out on a qQ-TOF hybrid mass spectrometer (Q-Star Pulsar; Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) operated in positive mode. LC-MS data were acquired using a Dionex U3000 micro-HPLC system using a Zorbax 300 SB C8 column (3.5 µm, 150 mm by 1 mm/ *Agilent*) connected to the Q-Star Pulsar Qq-TOF mass spectrometer operated in positive mode. Separations were performed by gradient elution from 0% to 60% acetonitrile in 0.1% aqueous TFA for 20 min at a flow rate of 40 µl/min. Detection wavelength was set at 226 nm and ESI source was operated in positive mode with a spray voltage of 100 eV.

2.7 Edman N-terminal sequencing

N-terminal sequencing was carried out at the microsequencing platform of Institut Pasteur, France, using a Procise 492 sequencer (Applied Biosystems).

2.8. Plasmid DNA purification

Plasmid DNA of strain KM432Bz was purified using the Plasmid Midi Kit (*Qiagen*). Lysis step was carried out according to Anderson and McKay (Anderson et al., 1983). Two hundreds mL of the producing strain culture were centrifugated at 8,000 x g for 15 min at 4 °C. The pellet was treated with 10 mg/mL lysozyme (Sigma) in Tris-HCl buffer 25 mM pH 8 for 1 h at 37°C, followed by 20 mg/mL proteinase K (Sigma) in Tris-HCl 50 mM pH 7.7 for 1 h at 55°C. After vortexing for 30 s, the lysate was incubated at 37°C for 10 min. Plasmid purification was performed as recommended by the manufacturer.

2.9. PCR Amplification

Amplifications by PCR were carried out with 1 UE Taq DNA polymerase (Promega), 100 nM of each primer (forward and reverse), 10 µM of each dNTP *(*Promega), 20 mM $MgCl_2$ *(*Promega) in 1X buffer (Promega) and 1 µL of DNA. The program was as follows 95 °C for 5 min, 35 cycles x (94 °C for 30 s, 48-60°C for 30 s, 72 °C for 3 min) then 72 °C for 5 min), on a Mastercycler Personal (Eppendorf). The primers used in this study are listed in table 2.

The amplified products were separated on a 0.5 or 1% (w/v) agarose gel stained with Gel Red® 0.0005% (v/v) (VWR) using an electrophoretic migration of 90 V for 25 min). They were visualized under UV illumination and the images were analyzed with Gel Capture USB2 (VWR). The molecular weight markers were 1 kb DNA Ladder (0.5 to 10 kb, NEB) and 100 bp DNA Ladder (0.1 to 1.51 kb, NEB).

3. Results and discussion

3.1. Identification of strain KM432Bz

Strain KM432Bz was isolated from boza, in the department of Microbiology in the University of Stellenbosch.

A biochemical identification kit using carbohydrate metabolism tests (API 50 CH strips/ Biomérieux) assigned strain KM432Bz to *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides/ dextranicum* with a value of 99.5%. A 1400 bp-fragment of the 16S RNA gene of strain KM432Bz was amplified by PCR using primers 27f and 1385r (Table 2). Sequencing of the amplicon followed by BLAST analysis revealed a similarity value of 98% with *Ln. pseudomesenteroides* strain CAG16b. Although other *Leuconostoc* bacteriocin-producing strains had been isolated from boza, none of them belonged to the specie *pseudomesenteroides*.

3.2. Bacteriocin production kinetics

In order to determine the optimal growth stage for the production of the bacteriocin, the inhibitory activities of culture supernatants over *Lb. sakei* subsp. *sakei* CIP 103139 were monitored during growth (Fig. 1). Antimicrobial activity was detected at 5 h post-inoculation (logarithmic phase) until late stationary phase, with maximum inhibition halos (12-16 mm) corresponding to the early stationary phase (17-21 h after inoculation). This pattern of production is similar to those observed previously for other bacteriocins, including bacteriocins JW3BZ, JW6BZ, JW11BZ and JW15BZ isolated previously from boza (von Mollendorff et al., 2006).

3.3. Purification of bacteriocin KM432Bz

Purification of bacteriocin KM432Bz was performed from a 2 L culture supernatant of *Ln. pseudomesenteroides* KM432Bz in early stationary phase. After precipitation with 60% ammonium sulphate, the protein pellet was resuspended in water and submitted to reversed-phase extraction using an isopropanol gradient. The fraction corresponding to 40% isopropanol exhibited the largest inhibition halo on *Lb. sakei* subsp. *sakei* CIP 103139 (data not shown). This fraction was further purified by reversed-phase HPLC (Fig. 2). Peaks

were hand-collected and tested for antimicrobial activity on *Lb. sakei* subsp. *sakei* CIP 103139, *Listeria ivanovii* subsp. *ivanovii* CIP 78.42 and *Li. monocytogenes* CIP 80.110. Only one peak (43% of acetonitrile, retention time 18.7 min) retained antimicrobial activity on sensitive strains, with an inhibition halo of 14 mm and 12 mm for both *Listeria* strains. The purified bacteriocin KM432Bz was subjected to gel electrophoresis. Following overlay of the gel with *Li. monocytogenes*-seeded agar, an inhibitory zone was detected for a compound having a molecular mass comprised between 1.7 and 4.6 kDa (data not shown).

3.4. Determination of the amino acid sequence of the bacteriocin KM432Bz

The purified bacteriocin KM432Bz was analysed by MALDI-TOF MS in linear mode and by ESI MS. MALDI-TOF MS analysis revealed a single MH^+ ion at *m/z* 3928 (Fig. 3A.), while ESI-MS showed two ions $[M+5H]^{5+}$ and $[M+4H]^{4+}$ at *m/z* 786.96 and 963.21 respectively (Fig. 3B.), corresponding to a compound of 3931 Da. This was consistent with the range of the active peptide detected by gel overlay.

Edman degradation analysis revealed a 22-residue N-terminal sequence (Fig. 4, underlined part of the sequence). The sequence of the bacteriocin KM432Bz was also analyzed by mass spectrometry from a digest with the GluC endoproteinase (Fig. 4, arrow). Two peptide fragments corresponding to the Lys1-Glu20 N-terminal moiety and the Ala21-Trp37 C-terminal region were purified and analyzed by micro-LC-tandem MS (LC-MS/MS). The combined results of these experiments revealed the full amino acid sequence of the active bacteriocin (Fig. 4, black letters), which was assigned to a 37 residue peptide, in agreement with the 3931 Da mass obtained by MALDI-TOF-MS. This sequence was deposited in the Genbank database under accession numbers xxx. BLAS analysis revealed 100% identity of the bacteriocin KM432Bz with leucocin A from *Leuconostoc gelidum* (Hastings et al., 1991) and leucocin B from *Leuconostoc carnosum* (Felix et al., 1994). Therfore, bacteriocin KM432Bz was termed leucocin KM432Bz. Its amino acid sequence, like those of leucocins A and B, harbours the YGNGV consensus typical to class IIa bacteriocins (Fig 4, ligh grey background), as well as the two cysteines involved in a disulfide bond (Fig.4, dark grey background).

3.4. Analysis of the gene cluster encoding leucocin KM432Bz

Class IIa bacteriocins are generally produced as an inactive precursor carrying a signal sequence for export by an ABC transporter. The N-terminal proteolytic activity of the ABC transporter allows cleavage of the N-terminal leader peptide to yield the active bacteriocin (Ennahar et al., 2000). Leucocin A (Hastings et al., 1991) and B (Felix et al., 1994) differ from each other only by the sequence of their leader peptides. In order to determine whether the sequence of the leucocin KM432Bz leader peptide was similar or not to those of leucocin A or B, we aimed to sequence the gene cluster encoding leucocin KM432Bz. We therefore aligned the DNA sequences of the partial leucocin gene clusters available in Genbank (M64371, S72922) and designed primers specific to different regions of the gene cluster (Table 2). Several primer sets were used in PCR amplification, and two fragments of expected molecular masses could be obtained using primers preleuB-F/ preleuB-R and LeucoA-591F/ preleuB-R encompassing the structural gene and part of the immunity gene, primers preleuB-F/ LeucoA-150R encompassing the intergenic DNA sequence and primers lcaD_F and mesC_R1 surrounding the ABC transporter gene. The general organization of the gene cluster encoding leucocin KM432Bz seems to follow the same pattern as that of leucocin A from *Ln. gelidum* (Fig. 5) for which the genes encoding the bacteriocin precursor and immunity are termed *lcaA* and *lcaI* respectively and *lcaC*, *lcaD* and *lcaE* encod the protein with unknown function, the ABC transporter and an accessory protein (Fig. 5).

Following cloning in pGEM®-T Easy vector, the fragments were sequenced using universal primers M13-F and M13-R and revealed 100%, 100%, 96% similarities to genes encoding the bacteriocin precursor from *Ln. carnosum* (Felix et al., 1994), *Ln. pseudomesenteroides* (Sawa et al., 2010) and *Ln. gelidum* (Hastings et al., 1991), respectively. ABC transporter gene is similar at 96% and 81% to the gene encoding the ABC transporter from *Ln. gelidum* (van Belkum et al., 1995) and *Ln. mesenteroides* (Fremaux et al., 1995), respectively. For the immunity gene, the partial sequence obtained here displayed 99%, 99% and 90% similarities to genes encoding the immunity protein from *Ln. gelidum* (Hastings et al., 1991), *Ln. carnosum* (Felix et al., 1994) and *Ln. pseudomesenteroides* (Sawa et al., 2010), respectivly.

Translation of the nucleotide sequence of the structural gene gene revealed that the leader peptide was similar to that of leucocin B and leucocin A-QU15 (Fig 4). Leucocin B

and leucocin A-QU15 are the same bacteriocin. We therefore designated that gene *lckA* encodes the precursor of the leucocin KM432Bz. However, all our attempts to amplify the DNA fragments located between *lckA* and *lckD*, which potentially comprise a gene encoding a protein of unknown function, were unsuccessful. It is possible that both parts of the cluster may be physically separated, either on the same replicon by insertion of a mobile sequence, or on different replicons. If this is the case, it does not seem to affect regulation of the production of leucocin KM432Bz in this strain. Investigations are currently undergoing to elucidate this point.

Besides leucocin A and B/ A-QU15, leucocin KM432Bz is also very similar to yet another bacteriocin produced by the genus *Leuconostoc*, mesentericin Y105 from *Ln. mesenteroides* (Fremaux et al., 1995). The production of bacteriocins of the leucocin/mesentericin type could be a general characteristic of *Leuconostoc* sp. To address this question, we investigated by a molecular approach whether other species of *Leuconostoc* were prone to produce these bacteriocins. Primers preleuB-F and preleuB-F were used to amplify a 178 bp-fragment of the bacteriocin structural gene of five species of *Leuconostoc* (*Ln. carnosum*, *Ln. citreum*, *Ln. gelidum*, *Ln. pseudomesenteroides*, *Ln. mesenteroides* susbsp *dextranicum*, and *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*). In all cases, the gene was present (data not shown), suggesting the presence of a gene cluster encoding production of this type of bacteriocin in all *Leuconostoc* species.

3.5. Antimicrobial activity of leucocin KM432Bz

The inhibitory activity of leucocin KM432Bz was tested over a large range of Gram positive bacterial strains and one Gram negative strain, using the radial diffusion assay (Table 1, first column). Leucocin KM432Bz does not inhibit the growth of *Klebsiella pneumoniae*, as generally reported for class II bacteriocins, which are generally inactive on Gram negative bacteria. The spectrum of inhibition of leucocin KM432Bz includes closely-related strains of *Leuconostoc*, *Lactobacillus* or *Weissella*. Interestingly, not all *Leuconostoc* strains were resistant to leucocin KM432Bz, although our evidence suggests that they may all possess the gene cluster. This could be due to differences in the regulation of the expression of the bacteriocin and the immunity protein among the strains we tested and/or to diversity of the immunity proteins.

Leucocin KM432Bz also inhibits the growth of enteric pathogenic strains, such as *Enterococcus faecium* HKLHS and *Enterococcus faecalis* CIP 103015, or one respiratory tract pathogen, *Streptococcus pneumoniae* CIP 102911. One characteristic of class IIa bacteriocins is their potent inhibition of *Listeria* strains. This was confirmed for leucocin KM432Bz, which was active against the four strains of *Listeria* tested here, *Li. innocua* CIP 80.11, *Li. ivanovii* subsp. *ivanovii* CIP 78.42, *Li. monocytogenes* CIP 80.110 and *Li. monocytogenes* CIP 107776. We determined the MICs of leucocin KM432Bz over a range of sensitive strains as comprised between 78 nM and 10 µM, and compared them to those obtained for pediocin AcH, a class IIa bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* (Motlagh et al., 1994). The molecular mass of the commercial pediocin was determined by mass spectrometry analysis and is identical to those of the pediocin AcH of 6622 Da (Data not shown).

This bacteriocin has been shown to be highly effective in controlling the growth of the food pathogen *Li. monocytogenes* in raw meat and cheese-based creams and sauces (Buyong et al., 1998, Foegeding et al., 1992, Schlyter et al., 1993). It is currently being used in a commercial food preservative named Alta^{TM} 2341 (Carrigaline, Deegan et al., 2006). In our experiment, leucocin KM432Bz revealed to be more active than pediocin AcH, regarding the inhibition of *Listeria* species, with a very low MIC (156 nM) on *Li. monocytogenes* CIP 80110, while it is generally less effective than pediocin to inhibit growth of other lactic acid bacteria. Therefore, leucocin KM432Bz harbours a very good potential to be used as a food preservative, since it clearly inhibits the pathogen *Li. monocytogenes,* while preserving other non pathogenic bacteria generally considered as positive for human health.

3.6. Insights into the mode of action of leucocin KM432Bz

To gain insights into the mode of action of leucocin KM432Bz, we observed the impact of the addition of the bacteriocin to liquid cultures of two sensitive strains, one being the human pathogen *Li. monocytogenes* CIP 80110 , the other being *Lb. sakei* subsp. *sakei* CIP 103139 (Fig. 6). For both strains, addition of 10 µM of leucocin KM432Bz following inoculation resulted in no growth for 12 h, while addition during early log phase led to an immediate decrease in viable cells (Fig. 6A and B). However, after 25 h of culture, *Lb. sakei* subsp. *sakei* CIP 103139 reached the same OD_{620nm} as the control (Fig. 6A), while *Li.*

monocytogenes still showed no sign of growth (Fig. 6B). This suggests that leucocin KM432Bz exhibits a bacteriostatic effect on *Lb. sakei* subsp. *sakei* CIP 103139 and a bactericidic effect on *Li. monocytogenes* CIP 80.110, a property which adds arguments to the potentiality of this bacteriocin for use as a food preservative.

The mode of action of classIIa bacteriocins has been clearly demonstrated in the case of mesentericin Y105, whose amino acid sequence is very close to that of leucocin KM432Bz (V/I at position 26, fig. 2). Inactivation of the *rpoN* gene encoding the sigma 54 transcription factor induces resistance of *Li. monocytogenes* to mesentericin Y105 (Robichon et al., 1997). The sigma 54 transcription factor triggers transcription of a gene encoding the EII^{t}_{Man} manose permease, which has been proposed as the receptor of mesentericin Y105 on the surface of the target strain (Dalet et al., 2001). To determine whether the mode of action of leucocin KM432Bz was similar to that of mesentericin Y105, we performed antimicrobial assays over a strain of *Li. monocytogenes* inactivated for *rpoN*. This strain (EGDE *rpoN*$^{-}$) was resistant to leucocin KM432Bz, while the wild-type EGDE strain retained sensitivity (Table 2).

This work is the first thorough characterization of a bacteriocin produced by a strain isolated from boza. Leucocin KM432Bz is a class IIa bacteriocin closely related to mesentericin Y105 and leucocin A and B, with properties that indicate it would be a good candidate to be used as a food microbial control agent, as it is more effective than pediocin against the major human pathogen *Li. monocytogenes*. This study also brings light onto understanding the origin of the good conservation of boza.

Acknowledgements:

This work was supported by the joint programme CNRS-NSF.

We are grateful to Yann Héchard for the generous gifts of the *Listeria monocytogenes rpoN*$^{-}$ strains. We thank Manon Vandervennet and Gérard Gastine for careful technical assistance with the bacteriology. We thank Jacques d'Alayer (Plate-Forme d'Analyse et de Microséquençage des proteins, Institut Pasteur) for the N-terminal sequencing. We thank the mass spectrometry facility (Plate-Forme de Spectrométrie de Masse) at the National Museum of Natural History and Séverine Zirah for assistance with mass spectrometry.

References

Abee, T., Krockel, L.,Hill, C., 1995. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. Int J Food Microbiol. 28, 169-185.

Anderson, D. G.,McKay, L. L., 1983. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. Appl Environ Microbiol. 46, 549-552.

Bulet, P., Cociancich, S., Reuland, M., Sauber, F., Bischoff, R., Hegy, G., Van Doresselaer, A., Hertu, C.,Hoffmann, J. A., 1992. A novel insect defensin mediates the inducible antibacterial activity in larvae
of the dragonfly *Aeschna cyanea* (Paleoptera, Odonata). Eur J Biochem. 209, 9776984.

Buyong, N., Kok, J.,Luchansky, J. B., 1998. Use of a genetically enhanced, pediocin-producing starter culture, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM217, To control *Listeria monocytogenes* in cheddar cheese. Appl Environ Microbiol. 64, 4842-4845.

Carrigaline, C. C., Ireland, Alta. Kerry Bioscience

Chatterjee, C., Paul, M., Xie, L.,van der Donk, W. A., 2005. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. Chem Rev. 105, 633-684.

Cotter, P. D., Hill, C.,Ross, R. P., 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nat Rev Microbiol. 3, 777-788.

Dalet, K., Cenatiempo, Y., Cossart, P.,Héchard, Y., 2001. A sigma(54)-dependent PTS permease of the mannose family is responsible for sensitivity of *Listeria monocytogenes* to mesentericin Y105. Microbiology. 147, 3263-3269.

Deegan, L. H., Cotter, P. D.,Hill, C., 2006. Bacteriocins: biological tolls for bio-preservation and shelf-life extension. Int Dairy J. 16, 1058-1071.

Drider, D., Fimland, G., Hechard, Y., McMullen, L. M.,Prevost, H., 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. Microbiol Mol Biol Rev. 70, 564-582.

Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K.,Ishizaki, A., 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. FEMS Microbiol Rev. 24, 85-106.

Felix, J. V., Papathanasopoulos, M. A., Smith, A. A., von Holy, A.,Hastings, J. W., 1994. Characterization of leucocin B-Ta11a: a bacteriocin from *Leuconostoc carnosum* Ta11a isolated from meat. Curr Microbiol. 29, 207-212.

Foegeding, P. M., Thomas, A. B., Pilkington, D. H.,Klaenhammer, T. R., 1992. Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by in situ-produced pediocin during dry fermented sausage production. Appl Environ Microbiol. 58, 884-890.

Fremaux, C., Héchard, Y.,Cenatiempo, Y., 1995. Mesentericin Y105 gene clusters in *Leuconostoc mesenteroides* Y105. Microbiology. 141 (Pt 7), 1637-1645.

Gotcheva, V., Pandiella, S. S., Angelov, A., Roshkova, Z. G.,Webb, C., 2000. Microflora identification of the Bulgarian cereal-based fermented beverage boza. Process Biochemistry. 36, 127-130.

Hancioğlu, O.,Karapinar, M., 1997. Microflora of Boza, a traditional fermented Turkish beverage. Int J Food Microbiol. 35, 271-274.

Hastings, J. W., Sailer, M., Johnson, K., Roy, K. L., Vederas, J. C.,Stiles, M. E., 1991. Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. J Bacteriol. 173, 7491-7500.

Jack, R. W., Tagg, J. R.,Ray, B., 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Microbiol Rev. 59, 171-200.

Kabadjova, P., Gotcheva, I., Ivanova, I.,Dousset, X., 2000. Investigation of bacteriocin activity of lactic acid bacteria isolated from boza. Biotechnol Biotechnol Equip. 14, 56-59.

Klaenhammer, T. R., 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Rev. 12, 39-85.

Motlagh, A., Bukhtiyarova, M.,Ray, B., 1994. Complete nucleotide sequence of pSMB 74, a plasmid encoding the production of pediocin AcH in *Pediococcus acidilactici*. Lett Appl Microbiol. 18, 305-312.
Rheims, H., Sproer, C., Rainey, F. A.,Stackebrandt, E., 1996. Molecular biological evidence for the occurrence of uncultured members of the actinomycete line of descent in different environments and geographical locations. Microbiology. 142 (Pt 10), 2863-2870.
Robichon, D., Gouin, E., Debarbouille, M., Cossart, P., Cenatiempo, Y.,Héchard, Y., 1997. The *rpoN* (sigma54) gene from *Listeria monocytogenes* is involved in resistance to mesentericin Y105, an antibacterial peptide from *Leuconostoc mesenteroides*. J Bacteriol. 179, 7591-7594.
Sawa, N., Okamura, K., Zendo, T., Himeno, K., Nakayama, J.,Sonomoto, K., 2010. Identification and characterization of novel multiple bacteriocins produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* QU 15. J Appl Microbiol. 109, 282-291.
Schagger, H.,von Jagow, G., 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal Biochem. 166, 368-379.
Schlyter, J. H., Glass, K. A., Loeffelholz, J., Degnan, A. J.,Luchansky, J. B., 1993. The effects of diacetate with nitrite, lactate, or pediocin on the viability of *Listeria monocytogenes* in turkey slurries. Int J Food Microbiol. 19, 271-281.
Settanni, L.,Corsetti, A., 2008. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. Int J Food Microbiol. 121, 123-138.
Stiles, M. E., 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek. 70, 331-345.
Tagg, J. R., Dajani, A. S.,Wannamaker, L. W., 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Bacteriol Rev. 40, 722-756.
Todorov, S. D.,Dicks, L. M., 2004a. Characterization of mesentericin ST99, a bacteriocin produced by Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum ST99 isolated from boza. J Ind Microbiol Biotechnol. 31, 323-329.
Todorov, S. D.,Dicks, L. M., 2004b. Screening of lactic-acid bacteria from South African barley beer for the production of bacteriocin-like compounds. Folia Microbiol (Praha). 49, 406-410.
van Belkum, M. J.,Stiles, M. E., 1995. Molecular characterization of genes involved in the production of the bacteriocin leucocin A from *Leuconostoc gelidum*. Appl Environ Microbiol. 61, 3573-3579.
von Mollendorff, J. W., Todorov, S. D.,Dicks, L. M., 2006. Comparison of bacteriocins produced by lactic-acid bacteria isolated from boza, a cereal-based fermented beverage from the Balkan Peninsula. Curr Microbiol. 53, 209-216.

Table 1.

Strains used in this study and their sensitivity to leucocin KM432Bz and pediocin AcH* (Motlagh et al., 1994).

Strains	**Conditions**	**Leucocin KM432Bz**		**Pediocin***
		Radial diffusion assay	**MICs (µM)**	**MICs (µM)**
Bacillus subtilis subsp. *subtilis* CIP 52.65	37 °C, LB	−	ND	ND
Enterococcus faecalis CIP 103015	37 °C, BHI	+	>10	ND
Enterococcus faecium CIP 103014	37 °C, BHI	−	ND	ND
Enterococcus faecium HKLHS	37 °C, BHI	+	2.5	2.5
Klebsiella pneumoniae subsp. *pneumoniae* CIP 82.91	37 °C, LB	−	ND	ND
Lactobacillus plantarum CIP 104454	30 °C, MRS	−	ND	ND
Lactobacillus sakei subsp. *sakei* CIP 103139	30 °C, MRS	++	0.08	0.08
Leuconostoc carnosum CIP 103319	30 °C, MRS	−	ND	ND
Leuconostoc citreum CIP 103315	30 °C, MRS	−	ND	ND
Leuconostoc gelidum CIP 103318	30 °C, MRS	−	ND	ND
Leuconostoc lactis CIP 102422	30 °C, MRS	+	10	2.5
Leuconostoc mesenteroides Y105	30 °C, MRS	+	>10	ND
Leuconostoc mesenteroides subsp. *dextranicum* CIP 102423	30 °C, MRS	+	>10	ND
Leuconostoc mesenteroides subsp. *mesenteroides* CIP 102305	30 °C, MRS	++	1.25	0.16
Leuconostoc pseudomesenteroides CIP 103316	30 °C, MRS	++	>10	ND
***Leuconostoc pseudomesenteroides* KM432Bz**	30 °C, MRS	**−**	**ND**	**ND**
Listeria innocua CIP 80.11	37 °C, BHI	++	0.63	2.5
Listeria ivanovii subsp. *ivanovii* CIP 78.42	37 °C, BHI	++	0.31	>10
Listeria monocytogenes CIP 80.110	37 °C, BHI	+	0.16	5
Listeria monocytogenes EGDe CIP 107776	37 °C, BHI	+	0.31	ND
Listeria monocytogenes EGDe (*rpoN*⁻)	37 °C, BHI	−	ND	ND
Staphylococcus aureus subsp.*aureus* CIP 4.83	37 °C, LB	−	ND	ND
Streptococcus pneumoniae CIP102911	37 °C, TSYE	+	2.5	>10
Streptococcus thermophilus CIP 102303	37 °C, LB	−	ND	ND
Weissella paramesenteroides CIP 102421	30 °C, MRS	+	>10	ND

*Pediocin used in this study was identified as pediocin AcH by mass psectrometry.

Producing strain is indicated in bold letters.
+ : Inhibition halo < 20 mm.
++: Inhibition halo > 20 mm.
- : No inhibition.
ND: Not determined.

Table 2.

Primers used for PCR and DNA sequencing

Primers	Sequence (5’ ⩾ 3’)	Specificity/ localisation
M13-F	TTTTCCCAGTCACGACG	pGEM-T Easy Vector/176–197
M13-R	ACACAGGAAACAGCTATGACC	pGEM-T Easy Vector /2949–2972
LeucoA-591F	GCCATGTATTGGCCGTTT	immunity protein
préleuB-F	ACCAGAAACCATTTCCACCA	prebacteriocin
préleuB-R	AACATGAAATCTGCGGATAA	prebacteriocin
LeucoA-150R	TTGCATACCCTGTCTCCA	prebacteriocin / immunity protein
lcaD-F	GCCAAAACTGACATGGAAGG	ABC transporter
MesC_R1	AAGGAAAATTGCGGTAACG	ABC transporter/ mesC
27f	CGGTGTGTCAAGGCCC	16S RNA/ 10-28 (Rheims et al., 1996)
1385r	GAGTTTGATCCTGGCTCAG	16S RNA/ 1392-1408 (Rheims et al., 1996)

Figure legends

Figure 1.

Growth of strain KM432Bz (◆) and inhibition halos induced by culture supernatant on *Lb. sakei* subsp. *sakei* CIP 103139 (▫).

Figure 2.

Reversed-phase HPLC chromatogram of the 40% isopropanol fraction from Sep-Pak C18. Dark arrow indicates the active peak on *Lb. sakei* subsp. *sakei* CIP 103139 and *Li. ivanovii* subsp. *ivanovii* CIP 78.42.

Figure 3.

Mass spectrometry analysis of leucocin KM432Bz. (A) MALDI-TOF MS spectrum of the main RP-HPLC fraction containing leucocin KM432Bz showing a single MH^+ ion at *m/z* 3928; (B) ESI-MS spectrum of the main RP-HPLC fraction containing leucocin KM432Bz that exhibits the $[M+5H]^{5+}$ and $[M+4H]^{4+}$ ions at *m/z* 786.96 and 963.21, respectively.

Figure 4.

Amino acid sequence of leucocin KM432Bz and its alignment with class IIa bacteriocins from other *Leuconostoc* species, leucocin A, leucocin B, and mesentericin Y105. Black letters show the sequence of the mature peptide and light grey letters the sequence of the leader peptide. The sequence of the leader peptide of leucocin KM432Bz was obtained by translation of the nucleotide sequence. Black letters on light grey background indicate the typical class IIa bacteriocin consensus sequence. Cysteines involved in the formation of the conserved disulfide bridge are shown on dark grey background. The amino acid sequence of leucocin KM432Bz determined by Edman degradation is underlined. The amino acid sequence obtained by MS/MS fragmentation is indicated by a broken line. Arrow indicates the GluC endoprotease cleavage site. The alignments were performed with the ClustalW program.

Figure 5.

Organization of the gene cluster involved in the production and immunity of leucocin A-UAL 187 produced by *Ln. gelidum* (Hastings *et al.*, 1991, accession number M64371.1/

van Belkum *et al.,* 1995, accession number L40491.1) and possible organisation of that of leucocin KM432Bz (Genbank xxx) produced by *Ln. pseudomesenteroides* (this study). Open reading frames (ORFs) are indicated by arrows for the structural gene (*lcaA* and *lckA,* ▧), immunity gene (*lcaI, lckI* ▧), ABC-transporter gene (*lcaD, lckD* ▩), gene encoding the accessory protein (*lcaE, lckE* ▩), gene encoding an unknown protein (*lcaC, lckC* ▩). Promoters are presented with dark boxes (▪). Broken lines indicated not characterized DNA sequences.

Figure 6.

Growth of *Lb. sakei* subsp. *sakei* CIP 103139 (**A**) and *Li. monocytogenes* CIP 80.110 (**B**) following addition of 10 µM leucocin KM432Bz after inoculation (▲) or during early-log phase (◆).The control (■) shows growth in the absence of the bacteriocin. Arrows indicate addition of leucocin KM432Bz.

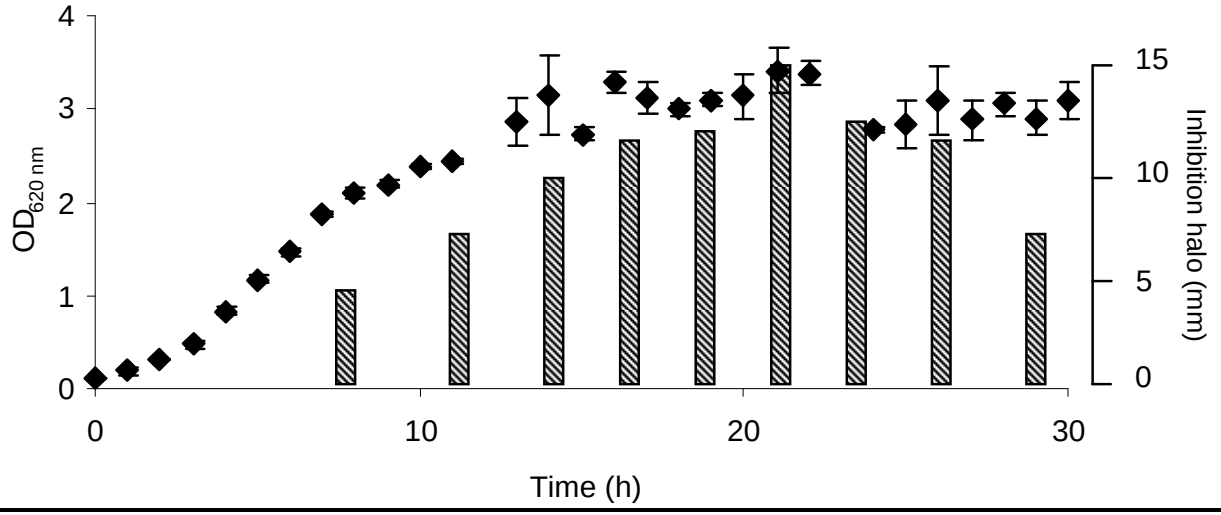


Fig. 1.

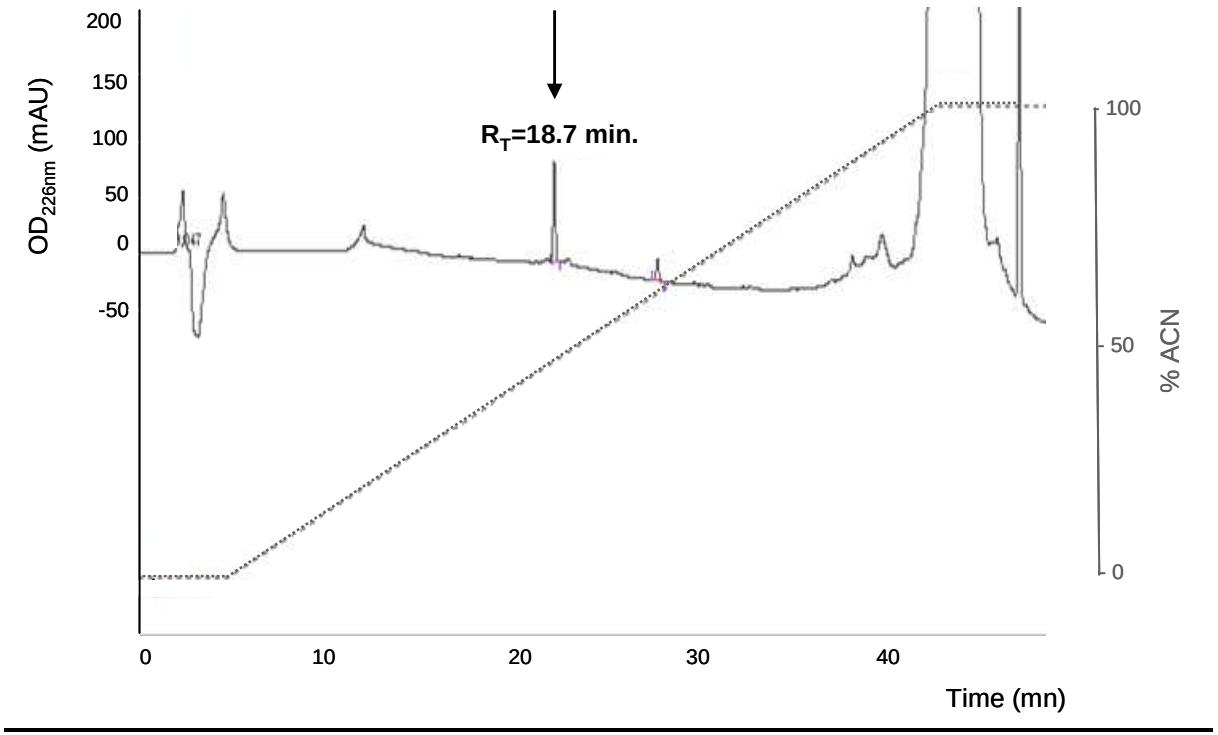

200
150
100
50
0
-50
OD226nm (mAU)
RT=18.7 min.
100
50
0
% ACN
0
10
20
30
40
Time (mn)

Fig. 2.

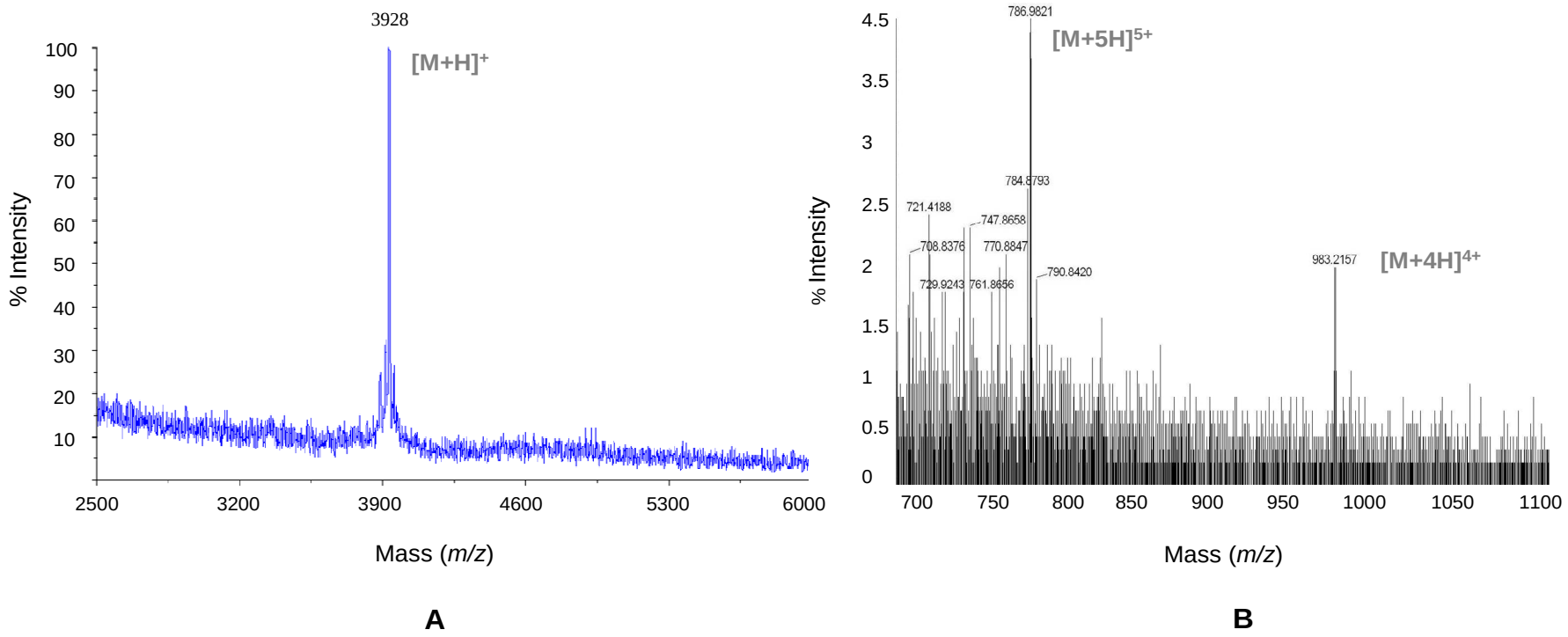

3928
[M+H]+
% Intensity
Mass (m/z)
A
786.9821
[M+5H]5+
784.8793
721.4188
747.8658
708.8376
770.8847
790.8420
729.9243
761.8656
983.2157
[M+4H]4+
% Intensity
Mass (m/z)
B

Fig. 3.

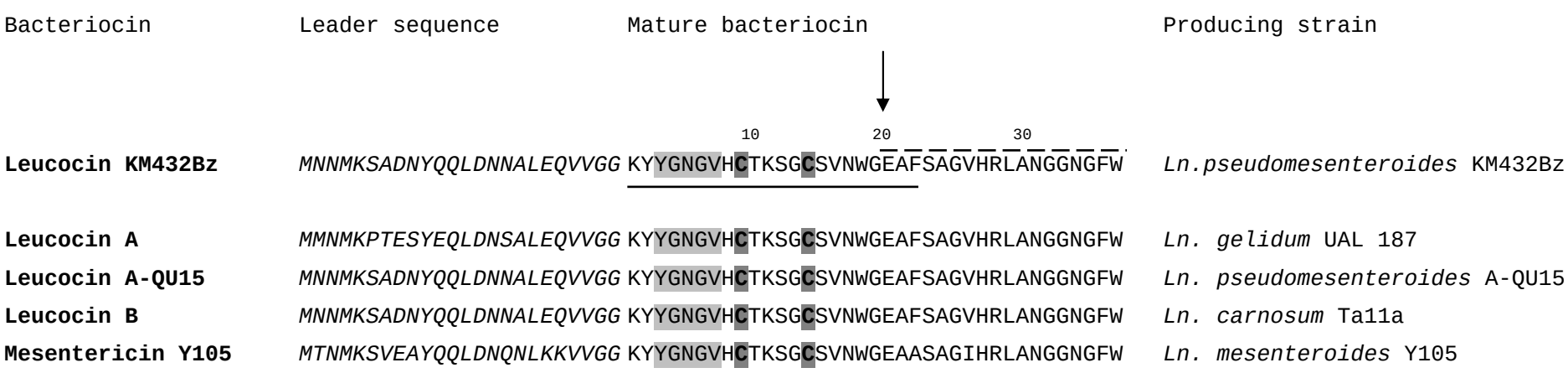

Bacteriocin
Leader sequence
Mature bacteriocin
Producing strain
10
20
30
Leucocin KM432Bz
MNNMKSADNYQQLDNNALEQVVGG KYYGNGVHCTKSGCSVNWGEAFSAGVHRLANGGNGFW
Ln.pseudomesenteroides KM432Bz
Leucocin A
MMNMKPTESYEQLDNSALEQVVGG KYYGNGVHCTKSGCSVNWGEAFSAGVHRLANGGNGFW
Ln. gelidum UAL 187
Leucocin A-QU15
MNNMKSADNYQQLDNNALEQVVGG KYYGNGVHCTKSGCSVNWGEAFSAGVHRLANGGNGFW
Ln. pseudomesenteroides A-QU15
Leucocin B
MNNMKSADNYQQLDNNALEQVVGG KYYGNGVHCTKSGCSVNWGEAFSAGVHRLANGGNGFW
Ln. carnosum Ta11a
Mesentericin Y105
MTNMKSVEAYQQLDNQNLKKVVGG KYYGNGVHCTKSGCSVNWGEAASAGIHRLANGGNGFW
Ln. mesenteroides Y105

Fig. 4.

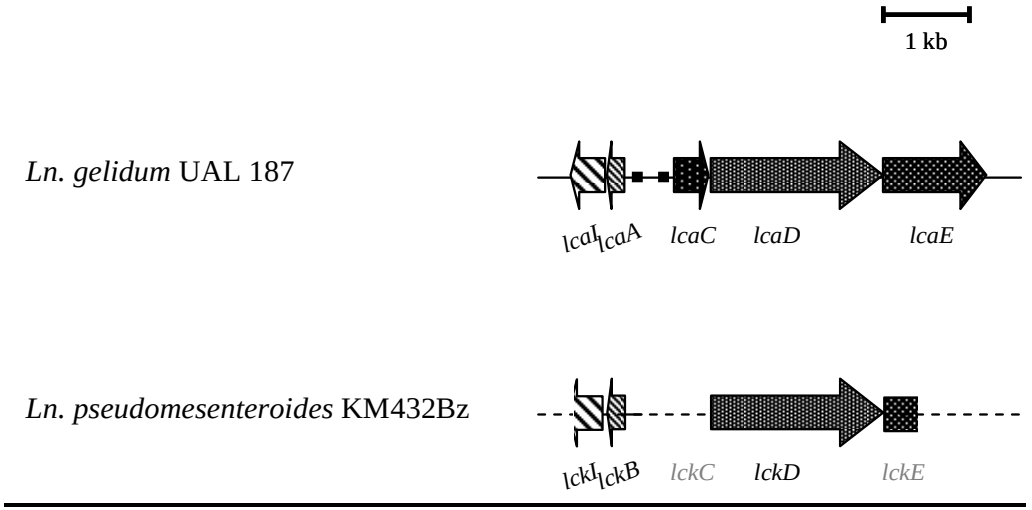

1 kb
Ln. gelidum UAL 187
lcaI
lcaA
lcaC
lcaD
lcaE
Ln. pseudomesenteroides KM432Bz
lckI
lckB
lckC
lckD
lckE

Fig. 5.

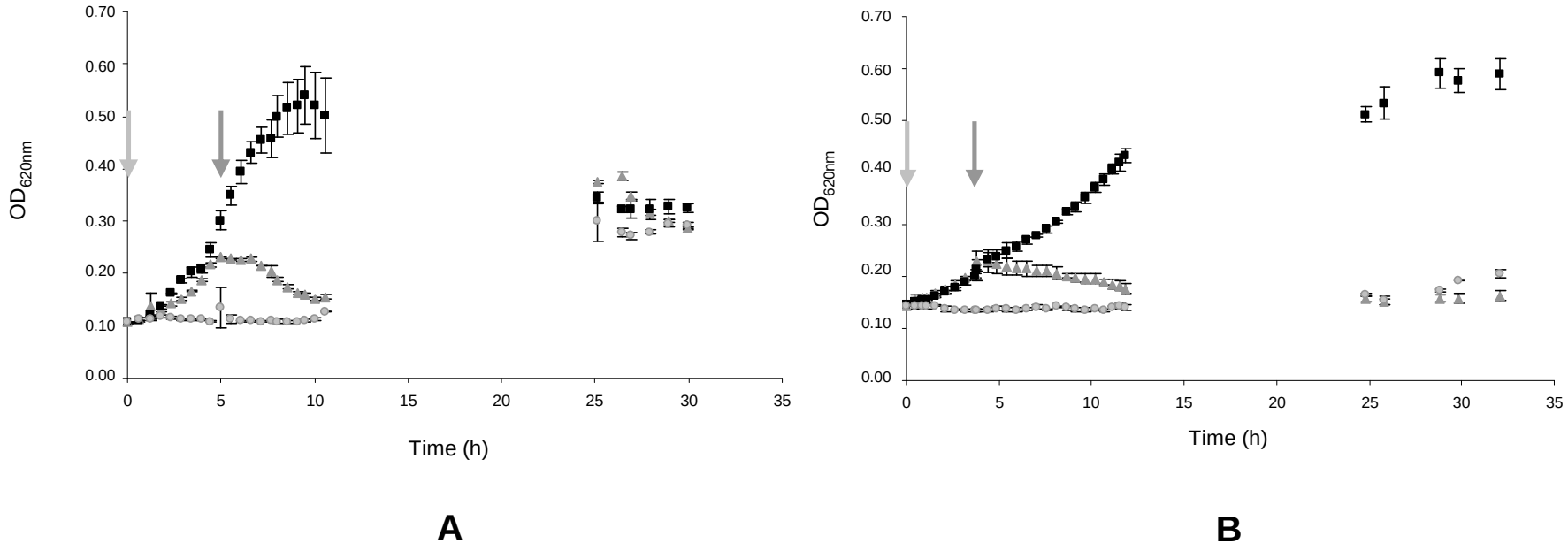

0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
OD620nm
0
5
10
15
20
25
30
35
Time (h)
A
B

Fig. 6.

II. Synthèse des résultats

II.1. Identification de la souche productrice KM432Bz

Une souche active contre *Lb. sakei* a été isolée du boza par J. W. von Mollendorff à l'université de Stellenbosch en Afrique du Sud (von Mollendorff *et al.*, 2006). Après séquençage du gène codant l'ARN 16S de cette bactérie et détermination des caractéristiques biochimiques de cette souche par galerie API CHL50, nous l'avons identifiée comme un *Ln. pseudomesenteroides* et nommée KM432Bz.

Afin de détecter la phase de croissance de la souche sélectionnée où se situait l'apparition de l'activité antimicrobienne et son maximum, nous avons réalisé une courbe de croissance et testé toutes les 2 h l'activité des surnageants de culture traités (voir **Matériels et Méthodes**) sur *Lb. sakei* subsp. *sakei*. L'activité antimicrobienne maximale a été retrouvée en début de phase stationnaire entre 17 et 21 h de culture.

→ La souche active isolée du boza est un *Ln. pseudomesenteroides* nommé KM432Bz présentant une activité antimicrobienne en début de phase stationnaire contre *Lb. sakei* subsp. *sakei*.

II.2. Caractérisation de la bactériocine KM432Bz

Afin d'isoler la molécule antimicrobienne produite par *Ln. pseudomesenteroides* KM432Bz, le surnageant de culture a d'abord été soumi à une précipitation par du sulfate d'ammonium à 60% de saturation. Le surnageant précipité a ensuite été centrifugé et son surnageant dyalisé puis élué à différents pourcentages d'isopropanol sur cartouche Sep-Pak® C18. Les fractions ainsi obtenues ont été testées sur *Lb. sakei* subsp. *sakei*. L'activité antimicrobienne a été retrouvée dans la fraction éluée à 40% d'isopropanol qui a ensuite été soumise à une CLHP en phase inverse sur colonne C18. Les pics observés ont été récoltés puis testés sur *Lb. sakei* subsp. *sakei* et *Li. innocua*. L'activité antimicrobienne a été retrouvée dans le pic majoritaire élué à 43% d'acétonitrile.

Les analyses réalisées par MALDI-TOF puis par ESI-MS sur la fraction active éluée à 43% d'ACN en CLHP ont révélé une masse moléculaire de 3930 Da. Le séquençage peptidique par dégradation d'Edman a permis la détermination des 22 premiers acides aminés de la bactériocine. Parrallèlement la bactériocine a été digérée par l'endoprotéase Glu-C, puis soumise à une fragmentation par LC-MS/MS. Les résultats obtenus par les deux méthodes

complémentaires ont donné une séquence en acides aminés identique à celle de deux bactériocines de classe IIa : la leucocine A et la leucocine B produites respectivement par *Ln. gelidum* et *Ln. carnosum*.

→ Le peptide antimicrobien produit par la souche KM432Bz est une bactériocine qui a une masse moléculaire de 3930 Da et la même séquence en acides aminés que les leucocines A-UAL 187 et B. Nous l'avons nommée leucocine KM432Bz.

II.3. Caractérisation du cluster de gènes impliqué dans la biosynthèse de la leucocine KM432Bz

Le gène codant le précurseur de la leucocine KM432Bz a été amplifié par PCR en utilisant des amorces degénérées (préleuB-F et préleuB-R), cloné dans le vecteur pGEM-T Easy Vector® puis séquencé. La séquence nucléotidique du gène codant le précurseur de la leucocine KM432Bz est identique à celle de la leucocine B produite par *Ln. carnosum*. Les régions nucléotidiques adjacentes ont été déterminées à partir de fragments d'ADN obtenus par PCR en utilisant des amorces spécifiques (**Table 1**, publication). Le gène codant la protéine d'immunité a été caractérisé presque dans son intégralité. Le gène codant l'ABC transporteur a également été caractérisé ainsi qu'une partie de la protéine accessoire impliquée dans l'export de la bactériocine (**Figure II. 3**).

```
Leu A   1       GTCCGTTTAC CCTCCGCAAA AAGCACAAAC AGCCCTCTCA TAAACCGCTC ACGGACTAAA
Leu A  61       ATTTCACAAA TGACAAAAGC CAAGCTGTAG GGATTGTGAG AGCTAGACCA ATAAATTTGA
Leu A 121       GCGAAATTCA CAAGAACAGA TCACAGAAAA AGCGCCAAAC CTTATGAAAT TAAGGCTTGG

Leu A 181       CGCTTTTAAC TTGGTATAAG CGACATTATG TTTACTAATA TATTATCAAA ATTATTTATC
Leu B   1       GCGTCGTACG CTAGTCGGAT AACGCATATG TTTACTAATA TATTATCAAA GTCATTTATC

Leu A 241       TTTCAAAGAT ACTATAAAAC TGAGATTTGT CAGAAAAATC AGCCATGTAT TGGCCGTTTA
Leu B  61       TTTCAAAGAT ACTATAAAAC TGAGATTTGT CAGAAAAATC AGCCATGTAT TGGCCGTTTA
KM 1                                                    TGCCATGTAT TGGCCGTTTA
                                                LeucoA-591F ------------------>

Leu A 301       ATCCAGCCTT CTGACCAATT ACACCAAGTT CTATAATTAC AGCCTCTTCA TCTTTTGAAA
Leu B 121       ATCCAGCCTT CTGACCAATT ACACCAAGTT CTATAATTAC CGCCTCTTCA TCTTTTGAAA
KM 21           ATCCAGCCTT CTGACCAATT ACACCAAGTT CTATAATTAC AGCCTCTTCA TCTTTTGAAA

Leu A 361       ACTTAATTCT GTTTGTTGAA GCGGTAATTC GTATATAATT GACCAATCGG TTAATCAATG
Leu B 181       ACTTAATTCT GTTTGTTGAA GCGGTAATTC GTATATAATT GACCAATCGG TTAATCAATG
Leu A-QU15 53         TCT GTTTGTTGAA GCGGTAATTC GTATATAATT GACCAATCGG TTAATCAATG
KM 81           ACTTAATTCT GTTTGTTGAA GCGGTAATTC GTATATAATT GACCAATCGG TTAATCAATG

Leu A 421       CTTCTACATT TTTTGTGCTA TCTAATTTTT TGGATACCTG AAACAAAACA TCACAAATAT
Leu B 241       CTTCTACATT TTTTGTGCTA TCTAATTTTT TGGATACCTG AAACAAAACA TCACAAATAT
Leu A-QU15 112  CTTCTACATT TTTTGTGCT- TCTAATTTTT TGGATACCTG AAACAAAGCA TCACAAATAT
KM 141          CTTCTACATT TTTTGTGCTA TCTAATTTTT TGGATACCTG AAACAAAACA TCACAAATAT

Leu A 481       CTCCATACCC AGCGTCATCT TTTCTATCGA TTAATAGCAA ATAGAGTTTG TTCGTGTATA
Leu B 301       CTCCATACCC AGCGTCATCT TTTCTATCGA TTAATAGCAA ATAGAGTTTG TTCGTGTATA
Leu A-QU15 172  CTCCATACCC AGCGTCATCT TTTCTATCGA TTAATAGCAA ATAGAGTTTG TTCGTGTATA
KM 201          CTCCATACCC AGCGTCATCT TTTCTATCGA TTAATAGCAA ATAGAGTTTG TTCGTGTATA

Leu A 541       TTTTAGCATC GTCCAATAAA ATGTTATTTT TTCTCAAAAT GAATACCTTC GACAGTTTTA
Leu B 361       TTTTAGCATC GTCCAATAAA ATGTTATTTT TTCTCAAAAT GA-TACCTTC GACAGTTTTA
Leu A-QU15 232  TTTTAGCATC GTCCAATAAA ATGTTATTTT TTCTCAAAAT GAATACCTTC GACAGTTTTA
KM 261          TTTTAGCATC GTCCAATAAA ATGTTATTTT TTCTCAAAAT GAATACCTTC GACAGTTTTA

Leu A 601       CCAGAAACCA TTTCCACCAT TTGCTAAACG ATGTACTCCA GCTGAAAAGG CTTCTCCCCA
Leu B 421       CCAGAAACCA TTTCCACCAT TTGCTAAACG ATGTACTCCA GCTGAAAAGG CTTCTCCCCA
Leu A-QU15 292  CCAGAAACCA TTTCCACCAT TTGCTAAACG ATGTACTCCA GCTGAAAAGG CTTCTCCCCA
KM 321          CCAGAAACCA TTTCCACCAT TTGCTAAACG ATGTACTCCA GCTGAAAAGG CTTCTCCCCA
                ------------------> préleuB-F

Leu A 661       GTTTACAGAA CAACCACTTT TTGTGCAATG AACTCCGTTA CCATAATACT TACCTCCTAC
Leu B 481       GTTTACAGAA CAACCACTTT TTGTGCAATG AACTCCGTTA CCATAATACT TACCTCCTAC
Leu A-QU15 352  GTTTACAGAA CAACCACTTT TTGTGCAATG AACTCCGTTA CCATAATACT TACCTCCTAC
KM 381          GTTTACAGAA CAACCACTTT TTGTGCAATG AACTCCGTTA CCATAATACT TACCTCCTAC

Leu A 721       GACTTGTTCG AGAGCACTAT TATCCAATTG CTCATAGCTT TCCGTAGGTT TCATGTTCAT
Leu B 541       GACTTGTTCG AGAGCATTAT TATCCAATTG CTGATAATTA TCCGCAGATT TCATGTTATT
Leu A-QU15 412  GACTTGTTCG AGAGCATTAT TATCCAATTG CTGATAATTA TCCGCAGATT TCATGTTATT
KM 441          GACTTGTTCG AGAGCATTAT TATCCAATTG CTGATAATTA TCCGCAGATT TCATGTTATT
                                                <------------ préleuB-R

Leu A 781       CATAATAACT TTCCTCTTTT CATATTATTT AATTCACATT CAATTATATA TCTAAAGGTA
Leu B 601       CATAATAACT TTCCTCTTTT CTTATTATTT AAATCACATT C-ATTATACA TCTAGAGGTA
Leu A-QU15 472  CATAATAACT TTCCTCTTTT CATATTATTT AATTCACATT CAATTATATA TCTAAAGGTA
KM 501          CATAATAACT TTCCTCTTTT CTTATTATTT AAATCACATT -AATTATACG TCTAGATTAA
```

```
Leu A 841        TTCTAAATCA A--TATGTTT ATGTTAATTT ATTAATTCTA TGTTTTATGT TAAAATTATA
Leu B 661        TCCTAAATCA AC-TATGTTT ATGTTAACTT ATTAATTCTA TGTTTTATGT TAAAATTATA
Leu A-QU15 530   TTCTAAATCA A--TATGTTT ATGTTAACTT ATTAATTCTA TGTTTTATGT TAAAATTATA
KM 561           TTCTTATTCA ACATATGTTG AT-TTATATA TATAAACCTA TTTTTTATGT TAACATTATG-

Leu A 901        T---TTGTTA ATTATTTCAC TTTTAATGGA GACAGGGTAT GCAAGATTTA AACAT--AAC
Leu B 721        TAT-ATGTTA ATTATGTCAC TTT-AATGGA GACAGGGTAT GCAAGATTTA TACATGAAAC
Leu A-QU15       TTT---GTTA ATTATTTCAC TTTTAATGGA GACAGGGTAT GCAAGATTTA AACAT--AAC
KM 621           ----ATGTTA ATTATTGAGC TTTTAATGGA GACAGGGTAT GCAA
                                                  <-------------  LeucoA-150R

Leu A 961        TGATGATG-T GGTTGTCAAA TATCAAAAAT TGACAGATGA TAAGAATGTG TTTCACAAAA
Leu B 781        TGATGCT--- GGTTGTCAAA TATC------ ---CAGA--- -AAG
Leu A-QU15       TGATGATG-T GGTTGTCAAA TATCAAAAAT TGACAGATGA TAAG

Leu A 1021       TATCATACAT TGACTTTTAT AAAAAAATGA ATAATGGAGA AGACAGTTTA ATTTACCTCG

Leu A 1081       GCAGGCCGAC ATGTCC
Leu A_ABC                   ATTT GT-TTAAATT TTTGCCCATG CTGCATGATA TTTTGACTAC

Leu A_ABC 1141   TACCAAAAAA TATGCGTGTT GCGTACTTCA ATGTTGATAA TTTTTTTAAA GATAATTCCT

Leu A_ABC 1201   CTGACAAAGC TAGTTATATT AATTTCTTTC AAGAGTTAAA TATTTCTCAA CTGCCTTCTT

Leu A_ABC 1261   TAATTTTTAC TAATGGAAAC ATGGACTATA AACGATTATC AATTTATACA ATTAAAACAC

Leu A_ABC 1321   CAATAAATGC ATGGATTACT GCTATTAATG ACGAATTAAT TTCAAAACAT TCCAAGCAAT

Leu A_ABC 1381   CATCAACAAA TTAAAAATGG TTAAGG-TCA AAATGTTTCA AAAAAGAATA AATTATATCG

Leu A_ABC 1441   CACAAGTAGA TGAACGTGAT TGTGGTGTTG CTGCACTCGC TATGGTTTTA ACTCATTACA

Leu A_ABC 1501   AAACACGCCT GTCCTTAGCC AAACTACGGG ACCTGGCCAA AACTGACATG GAAGGAACGA
                                                 lcaD_F ------------->

Leu A_ABC 15561  CTGCTTTAGG CATTGTTAAG CTGCGAATGC GCTAGACTTT GAAACCATGC CGATCCAGG
KM 1                       TTGTTA-G CTGCTAATGC GCTAGACTTT GAAACTATGC CTATCCAGG

Leu A_ABC 1621   CTGATTTGAG TTTATTCGAT AAAAAGGATT TACCCTATCC TTTTATCGCC CATGTCATTA
KM 61            CTGACTTGAG TTTATTTGAT AAAAAAGATT TACCCTATCC CTTTATCGCC CATGTGATTA

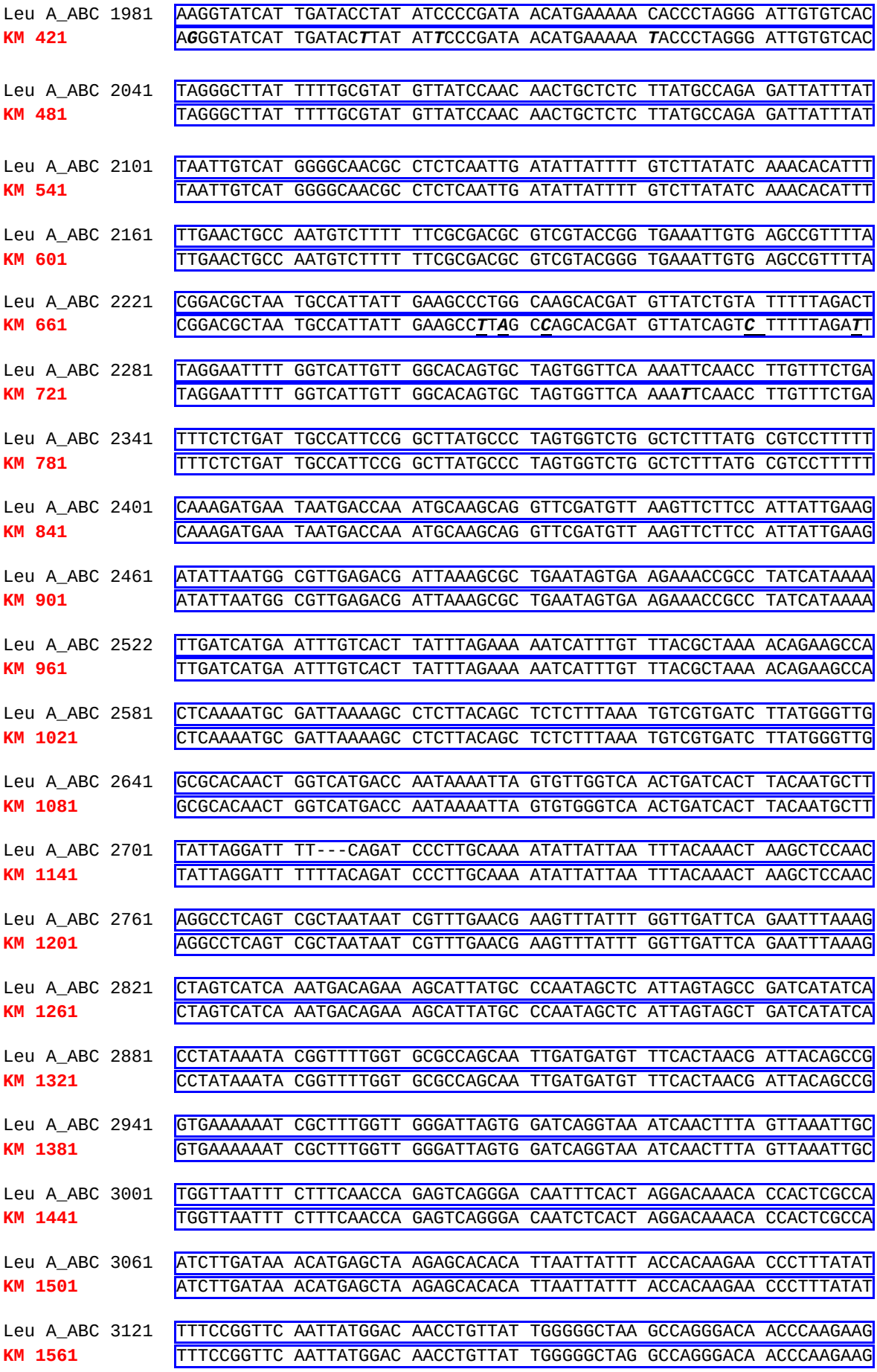
Leu A_ABC 1681   AAGACGGTAA ATACCCGCAT TATTATGTAG TTTATGGGAT CAAAGGTGAT CAGCTATTAA
KM 121           AAGAAGGGAA ATACCCACAT TACTATGTTG TTTATGGCAT TAAAGGGAAT CAGTTATTAA

Leu A_ABC 1741   TCGCTGATCC AGATAATACC GTTGGTAAAA ATAAAATGAC AAAAGCGCAT TTTAATGAGG
KM 181           TTGCTGATCC AGATGACACT GTTGGTAAAA CCAAAATGAC TAAAGCGCAT TTTAACGAAG

Leu A_ABC 1801   AGTGGACCGG TGTGTCCATT TTTATTGCGC CCAATCCAAC CTACAAGCCA ACAAAGGATA
KM 241           AATGGACCGG GGTGTCCATT TTTATTGCGC CCAATCCGAC CTATAAGCCA ACAAAAGATA

Leu A_ABC 1861   AAAAGCGTTC CTTGACTTCT TTTATTCCAG TGATTACGCG TCAAAAATTA TTAGTTATCA
KM 301           AAAAGCGTTC CTTGACTTCG TTTATTCCAG TGATTACGCG TCAAAAGATA TTAGTCATCA

Leu A_ABC 1921   ATATTGTCAT TGCTGCCTTG TTGGTTACCC TAGTGAGTAT TTTAGGATCA TATTATTTGC
KM 361           ATATTGTGAT TGCCGCCTTA TTAGTTACCC TTGTCAGCAT TCTAGGATCG TATTACTTAC
```


Leu A_ABC 1981 AAGGTATCAT TGATACCTAT ATCCCCGATA ACATGAAAAA CACCCTAGGG ATTGTGTCAC
KM 421 AGGGTATCAT TGATACTTAT ATTCCCGATA ACATGAAAAA TACCCTAGGG ATTGTGTCAC
Leu A_ABC 2041 TAGGGCTTAT TTTTGCGTAT GTTATCCAAC AACTGCTCTC TTATGCCAGA GATTATTTAT
KM 481 TAGGGCTTAT TTTTGCGTAT GTTATCCAAC AACTGCTCTC TTATGCCAGA GATTATTTAT
Leu A_ABC 2101 TAATTGTCAT GGGGCAACGC CTCTCAATTG ATATTATTTT GTCTTATATC AAACACATTT
KM 541 TAATTGTCAT GGGGCAACGC CTCTCAATTG ATATTATTTT GTCTTATATC AAACACATTT
Leu A_ABC 2161 TTGAACTGCC AATGTCTTTT TTCGCGACGC GTCGTACCGG TGAAATTGTG AGCCGTTTTA
KM 601 TTGAACTGCC AATGTCTTTT TTCGCGACGC GTCGTACGGG TGAAATTGTG AGCCGTTTTA
Leu A_ABC 2221 CGGACGCTAA TGCCATTATT GAAGCCCTGG CAAGCACGAT GTTATCTGTA TTTTTAGACT
KM 661 CGGACGCTAA TGCCATTATT GAAGCCTTAG CCAGCACGAT GTTATCAGTC TTTTTAGATT
Leu A_ABC 2281 TAGGAATTTT GGTCATTGTT GGCACAGTGC TAGTGGTTCA AAATTCAACC TTGTTTCTGA
KM 721 TAGGAATTTT GGTCATTGTT GGCACAGTGC TAGTGGTTCA AAATTCAACC TTGTTTCTGA
Leu A_ABC 2341 TTTCTCTGAT TGCCATTCCG GCTTATGCCC TAGTGGTCTG GCTCTTTATG CGTCCTTTTT
KM 781 TTTCTCTGAT TGCCATTCCG GCTTATGCCC TAGTGGTCTG GCTCTTTATG CGTCCTTTTT
Leu A_ABC 2401 CAAAGATGAA TAATGACCAA ATGCAAGCAG GTTCGATGTT AAGTTCTTCC ATTATTGAAG
KM 841 CAAAGATGAA TAATGACCAA ATGCAAGCAG GTTCGATGTT AAGTTCTTCC ATTATTGAAG
Leu A_ABC 2461 ATATTAATGG CGTTGAGACG ATTAAAGCGC TGAATAGTGA AGAAACCGCC TATCATAAAA
KM 901 ATATTAATGG CGTTGAGACG ATTAAAGCGC TGAATAGTGA AGAAACCGCC TATCATAAAA
Leu A_ABC 2522 TTGATCATGA ATTTGTCACT TATTTAGAAA AATCATTTGT TTACGCTAAA ACAGAAGCCA
KM 961 TTGATCATGA ATTTGTCACT TATTTAGAAA AATCATTTGT TTACGCTAAA ACAGAAGCCA
Leu A_ABC 2581 CTCAAAATGC GATTAAAAGC CTCTTACAGC TCTCTTTAAA TGTCGTGATC TTATGGGTTG
KM 1021 CTCAAAATGC GATTAAAAGC CTCTTACAGC TCTCTTTAAA TGTCGTGATC TTATGGGTTG
Leu A_ABC 2641 GCGCACAACT GGTCATGACC AATAAAATTA GTGTTGGTCA ACTGATCACT TACAATGCTT
KM 1081 GCGCACAACT GGTCATGACC AATAAAATTA GTGTGGGTCA ACTGATCACT TACAATGCTT
Leu A_ABC 2701 TATTAGGATT TT---CAGAT CCCTTGCAAA ATATTATTAA TTTACAAACT AAGCTCCAAC
KM 1141 TATTAGGATT TTTTACAGAT CCCTTGCAAA ATATTATTAA TTTACAAACT AAGCTCCAAC
Leu A_ABC 2761 AGGCCTCAGT CGCTAATAAT CGTTTGAACG AAGTTTATTT GGTTGATTCA GAATTTAAAG
KM 1201 AGGCCTCAGT CGCTAATAAT CGTTTGAACG AAGTTTATTT GGTTGATTCA GAATTTAAAG
Leu A_ABC 2821 CTAGTCATCA AATGACAGAA AGCATTATGC CCAATAGCTC ATTAGTAGCC GATCATATCA
KM 1261 CTAGTCATCA AATGACAGAA AGCATTATGC CCAATAGCTC ATTAGTAGCT GATCATATCA
Leu A_ABC 2881 CCTATAAATA CGGTTTTGGT GCGCCAGCAA TTGATGATGT TTCACTAACG ATTACAGCCG
KM 1321 CCTATAAATA CGGTTTTGGT GCGCCAGCAA TTGATGATGT TTCACTAACG ATTACAGCCG
Leu A_ABC 2941 GTGAAAAAAT CGCTTTGGTT GGGATTAGTG GATCAGGTAA ATCAACTTTA GTTAAATTGC
KM 1381 GTGAAAAAAT CGCTTTGGTT GGGATTAGTG GATCAGGTAA ATCAACTTTA GTTAAATTGC
Leu A_ABC 3001 TGGTTAATTT CTTTCAACCA GAGTCAGGGA CAATTTCACT AGGACAAACA CCACTCGCCA
KM 1441 TGGTTAATTT CTTTCAACCA GAGTCAGGGA CAATCTCACT AGGACAAACA CCACTCGCCA
Leu A_ABC 3061 ATCTTGATAA ACATGAGCTA AGAGCACACA TTAATTATTT ACCACAAGAA CCCTTTATAT
KM 1501 ATCTTGATAA ACATGAGCTA AGAGCACACA TTAATTATTT ACCACAAGAA CCCTTTATAT
Leu A_ABC 3121 TTTCCGGTTC AATTATGGAC AACCTGTTAT TGGGGGCTAA GCCAGGGACA ACCCAAGAAG
KM 1561 TTTCCGGTTC AATTATGGAC AACCTGTTAT TGGGGGCTAG GCCAGGGACA ACCCAAGAAG

```
Leu A_ABC 3181   ATATTATCAG GGCGGTAGAA ATTGCTGAAA TTAAAGATGA TATTGAAAAA ATGTCGCAAG
KM 1621          ATATTATCAG GGCGGTAGAA ATTGCTGAAA TTAAAGATGA TATTGAAAAA ATGTCGCAAG

Leu A_ABC 3241   GATTTGGCAC TGAACTCGCA GAAAGTGGCA ATATTTCGGG TGGTCAAAAA CAACGCATTG
KM 1681          GATTTGGCAC TGAACTCGCA GAAAGTGGCA ATATCTCGGG TGGTCAAAAA CAACGCATTG

Leu A_ABC 3301   CTTTAGCTAG AGCCATTTTA GTCGATTCTC CGGTGCTGAT TTTAGATGAG TCAACCAGTA
KM 1742          CTTTAGCTAG AGCCATTTTA GTCGATTCTC CGGTGATGAT TTTAGATGAG TCCACCAGTA

Leu A_ABC 3361   ATCTTGATGT TTTAACAGAA AAAAAGATTA TTGATAATCT CATGCAGTTA ACCGAAAAAA
KM 1803          ATCTTGATGT TTTAACAGAA AAAAAGATTA TTGATAATCT CATGCAGTTA ACCGACAAAA

Leu A_ABC 3421   CCATTATCTT TGTAGCGCAC CGCTTAACCA TTTCACAGCG AGTAGATCGT ATTCTAACCA
KM 1864          CTATTATCTT TGTGGCGCAC CGCTTAACCA TTTCACAGCG AGTGGACCGG ATTTTGACCA

Leu A_ABC 3481   TGCAAAACGG CAAAATTATC GAAGATGGCA CGCATAATAC TCTGCTTAAT GCCGGTGGTT
KM 1925          TGCAAAGCGG --AGATTATC GAAGATGGCC CGCATAATAC TCTGCTTAAT GCTGGTGGTT

Leu A_ABC 3541   TCTACGCGTC ATTGTTTAAT CATTAAGGAG ACCTGATGTT TGATCCAAAA TACTTAGAAA
KM 1986          TCTATGCGTC GTTGTTTAAT CATTAAGGAG ACCTGATGTT TGATCCAAAA TACTTAGAAA

Leu A_ABC 3601   GTGGCGAATT TTATCAACGT CGTTACCGCA ATTTTCCAAC TCTGATTATT GTGCCTATTT
KM 2047          GTGGCGAATT TTATCAACGT CGT
                                      <-------------------- mesC_R1

Leu A_ABC 3661   TTTTGTTAGT CGTGTTTATC ATTCTATTTA GCCTATTTGC TAAGCGTGAA ATTGTTGTCA

Leu A_ABC 3721   AAGCAAGTGG CGAAATTATT CCAGCCAAAG TGCTATCAGA TATCCAATCA ACCAGTAACA

Leu A_ABC 3781   ATGCCATCGA TAGTAACCAA TTAACTGAAA ATAAAGTGGT TAAAAAAGGC GATACCTTAG

Leu A_ABC 3841   TGACCTTTAC CAGTGGTAAT GAAAAAATAT CGTCTCAATT ACTGACGCAA CAACTTAATA

Leu A_ABC 3901   ATCTTAACGA CCGTCTAAAA AGTCTTGATA CCTATAAGCA GAGTATTGTT AACGGACGTA

Leu A_ABC 3961   GCGAATTTGG TGGCACAGAT CAATTTGGTT ATGATAGTCT ATTCAACGGC TATATGGCGC

Leu A_ABC 4021   AAGTTGATAC GTTGACGAGT GAATTTAATC AACAAAGTAG TGATAAACAA ACAGCTGATC

Leu A_ABC 4081   AACAAGCTAA TCATCAAATT GACGTTTTAA AACAAGGTCA ATCTAAAAAC AATCAACAAT

Leu A_ABC 4141   TAGCTAATTA TCAAGCTATT CTAACCAGTA TTAATAGCAA CACTAAACCG ACTAATAATC

Leu A_ABC 4201   CCTATCAAGC CATTTATGAT AATTATTCAG CCCAGTTAAA ATCAGCACAA ACAACTGATG

Leu A_ABC 4261   ATAAAGATCA AGTCAAGCAA ACTGCCTTAA GTAATGTACA ACAACAAATT GATCAATTAC

Leu A_ABC 4321   AAACAACGAG TAGTTCGTAT GATAGTCAAA TTGCTGGTAT TACAAAGAGT GGTCCTTTAT

Leu A_ABC 4381   CTCAAAGCAG TACCTTAGAT AAAATCGCTG ACTTGAAGCA ACAACAACTA GCGAGTGCTC

Leu A_ABC 4441   AAAAAGAAAT CAATGATCAG CAACAATCCT TAGATGAGTT AAAAGCCAAG CAATCCTCTG

Leu A_ABC 4501   CTAATGAGGA TTATCAAGAT ACGGTTATTA AAGCACCAGA AGATGGCATT TTACATTTAG

Leu A_ABC 4561   CCACTGACAA AACTAAAATC AAGTATTTCC CTAAAGGCAC AACCATTGCG CAAATTTATC

Leu A_ABC 4621   CTAAACTGAC GCAAAAAACA GCTTTGAATG TTGAGTACTA TGTGCCTGCC AGTAATATTA

Leu A_ABC 4681   TCGGCTTAAA GCAAAGACAA GCCATCCGTT TTGTAGCAAA TCAAAATGTC ACGAAACCGC
```

```
Leu A_ABC 4741  TCACCTTAAA CGGAACAATC AAAAGCATTA GTTCTGCACC AATAGCCAGT AAAGAGGGAT
Leu A_ABC 4801  CCTTTTATAA ATTAGTCGCG ACGATTCAGG CTAGCAAAAT AGACCGTGAA CAGATTAAAT
Leu A_ABC 4861  ATGGTCTTAA TGGTCGAATC ACAACCATAA AAGGGACTAA AACATGGTTT AATTATTATA
Leu A_ABC 4921  AAGACATTGT TTTAGGTGAG AATAATTAGC TAGGAAGATA AACACAATTT TTAAACGTGT
Leu A_ABC 4981  TTATCTTTTT TAGTCTCAAT GAAATTGTCG CCGAAGGTTT TTCTAGCCAA GTGGCAGGAC
Leu A_ABC 5041  ACAGAAAAAT GATAGTTGCT ACTGAAGGGA AGTTCAACTG CCACCAAAAA TAGTAACCGC
Leu A_ABC 5101  GCGACAGCCA ACCGCCACCA CAACAGTTAT GCTCGCCCGT GGTTATTATT ATCATTAACA
Leu A_ABC 5161  CTCTTACGTC TTTCTATGAT ACTTTTGAGC CACATTCTTA TAATGCTGCA ATCGACCTTT
Leu A_ABC 5221  TAGAAAATTG ATCTCATCAG AAATTTCTTT TAAGTGGTTA TCATCAGCAT GTTTACTAGC
Leu A_ABC 5281  AATATTTAAT TCTTTAATCC TACGTTTAAT CAACTTAGTA GTTTTAGTAT CTTTCATGTA
Leu A_ABC 5341  TTGATTATCT CAAAAAAACA CCCAACAAGG GCAATCAGTT TGATTTGAGC AGAGGAAGCC
```

Figure II. 3. Alignement des séquences nucléotidiques des clusters de gènes impliqués dans la biosynthèse des leucocines A (immunité et précurseur : genbank M64371.1, ABC : genbank L40491.1)**, B** (genbank S72922.1)**, A-QU15** (genbank AB499610) **et de la leucocine KM432Bz** (genbank xxx).

Les gènes présents sur le cluster de gènes impliqué dans la biosynthèse des bactériocines sont indiqués en différentes couleurs comme suit : *Précurseur de la bactériocine*, *Protéine d'immunité*, *Protéine de fonction inconnue*, *ABC transporteur*, *Protéine accessoire*. La localisation de chaque amorce nucléotidique utilisée (**table 2**, publication) dans l'étude est indiquée sur l'alignement par une flèche.

→ Le gène codant le précurseur de la leucocine KM432Bz a été entièrement caractérisé. Il a la même séquence nucléotidique que celui codant le précurseur de la leucocine B produite par *Ln. carnosum*. Le gène impliqué dans l'immunité est identique à celui impliqué dans l'immunité de la leucocine A produite par *Ln. gelidum* UAL 187. Quant au gène codant l'ABC transporteur de la leucocine KM432Bz, il partage 96% d'identité avec celui de la leucocine A.

II.4. Spectre d'activité de la leucocine KM432Bz

L'activité antimicrobienne de la leucocine KM432Bz a été testée à 10 µM sur gélose contre différentes bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Ses CMI ont été déterminées en milieu liquide sur les bactéries sensibles. La leucocine KM432Bz est active sur des souches phylogénétiquement proches de la souche productrice (**Figure I. 3**) comme *Lb. sakei* subsp. *sakei*, *Ln. lactis*, *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* et des pathogènes tels que *Li. monocytogenes* et *S. pneumoniae* avec des CMI comprises entre 0,08 et 10 µM.

Nous avons ensuite testé l'effet de la leucocine KM432Bz sur la croissance de deux bactéries sensibles en milieu liquide : *Lb. sakei* subsp. *sakei* et *Li. monocytogenes*. La bactériocine a été ajoutée en début de la culture bactérienne (t_0) ou en début de phase exponentielle. La bactériocine inhibe la croissance de ces deux bactéries. Mais contrairement à *Lb. sakei* subsp. *sakei*, *Li. monocytogenes* atteint la même DO_{620nm} que son contrôle en fin de phase stationnaire.

→ La leucocine KM432Bz est active contre des bactéries à Gram positif phylogénétiquement proches avec des CMI comprises entre 0,08 nM et 10 µM. La leucocine KM432Bz est également active contre des pathogènes telles que *Li. monocytogenes* pour laquelle elle présente une CMI de 156 nM. En revanche, elle est inactive contre toutes les bactéries à Gram négatif testées. Enfin, la leucocine KM432Bz exerce par ailleurs, un effet bactéricide sur la croissance de *Lb. sakei* subsp. *sakei* et un effet bactériostatique sur *Li. monocytogenes*.

III. Résultats complémentaires

III.1. Caractérisation de la leucocine KM432Bz

Afn de démontrer que laleucocine KM432Bz de masse moléculaire 3930 Da possède une activité antimicrobienne anti-*Listeria*, nous avons réalisé un « gel overlay ». Le gel Tris-tricine-SDS a été soumis à une électrophorèse puis découpé en deux parties. Une partie a été colorée au bleu de Coomassie G-250 et au nitrate d'argent et une autre a été soumise à un test antimicrobien.

Après coloration, aucune bande correspondant à la bactériocine KM432Bz n'a été obtenue. En revanche, la partie du gel soumise au test antimicrobien sur *Li. monocytogenes* CIP 80.110 a révélé un halo d'inhibition correspondant à une masse moléculaire comprise entre 1,7 et 4,6 kDa (**Figure II. 4**).

Le peptide de masse moléculaire 3930 Da présente une activité antimicrobienne dirigée contre *Li. monocytogenes* CIP 80.110.

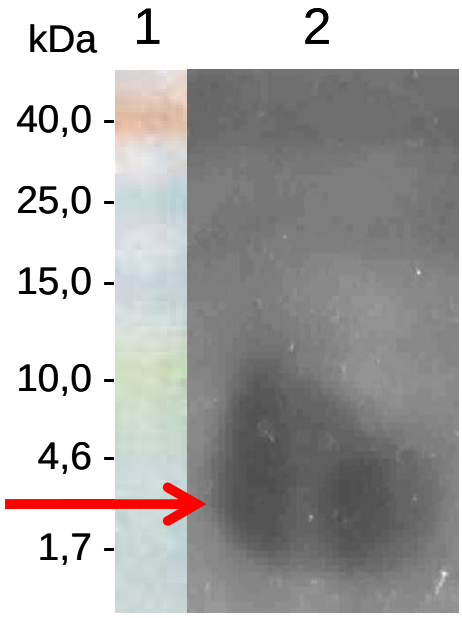


Figure II. 4. Electrophorèse Tris-tricine-SDS de la bactériocine KM432Bz. La piste **1** représente le marqueur précoloré de masses moléculaires (1.7 → 40 kDa, *Fermentas*). La piste **2** représente l'activité antimicrobienne contre *Li. monocytogenes* CIP 80.110. La flèche rouge indique le halo d'inhibition.

III.2. Implication de EII^{t}_{Man} dans le mode d'action de la leucocine KM432Bz

Des études ont montré que l'inactivation du gène *rpoN* codant le facteur de transcription σ54 induisait la résistance de *Li. monocytogenes* à la mésentéricine Y105 (Robichon *et al.*, 1997). σ^{54} est un facteur de transcription qui active l'expression du gène codant une mannose perméase du système des phosphotransférases EII^{t}_{Man}. Ce résultat suggére que EII^{t}_{Man} pourrait jouer le rôle de récepteur pour la mésentéricine Y105 lors du contact avec la membrane cytoplasmique de la bactérie cible (Dalet *et al.*, 2001). Afin de vérifier le rôle de EII^{t}_{Man} dans le mode d'action de la leucocine KM432Bz, nous avons testé l'activité antimicrobienne de la leucocine KM432Bz sur la souche de *Li. monocytogenes* inactivée pour le gène *rpoN* (*rpoN* $^{-}$) codant σ^{54}. Les mutants, générés par insertion d'un fragment nucléotidique de 1559 pb correspondant à la jonction Tn*917–lac*/ *rpoN* du plasmide pRT758 dans le gène *rpoN* (Dalet *et al.*, 2001, Robichon *et al.*, 1997), nous ont été aimablement forunis par le Professeur Yan Héchard (Université de Poitiers). Un contrôle positif a été réalisé en testant parrallèlement la leucocine KM432Bz sur la souche *Li. monocytogenes* sauvage (*rpoN* $^{+}$*).*

Des tests antimicrobiens de la leucocine KM432Bz contre les deux souches ont révélé que la souche *rpoN*$^+$ était sensible à la leucocine KM432Bz alors que la souche *rpoN*$^-$ était résistante (**Figure II. 5**). Ce résultat suggère que la leucocine KM432Bz utiliserait le même récepteur membranaire que la mésentéricine Y105 afin d'interagir avec la membrane cytoplasmique de la bactérie cible. La mutation du gène *rpoN* engendre la résistance des bactéries naturellement sensibles aux bactériocines de classe IIa, y compris à la leucocine KM432Bz.

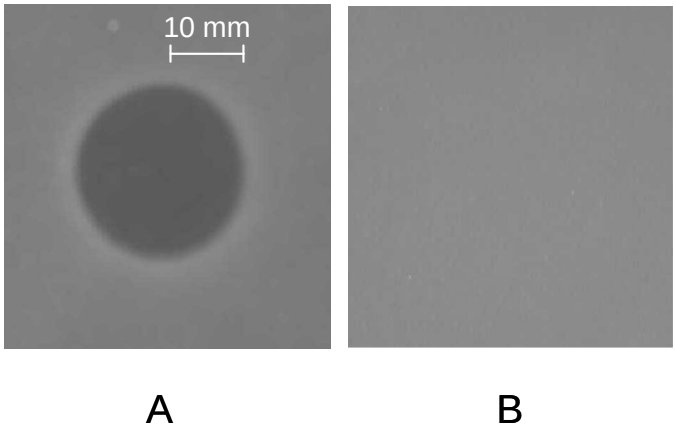


Figure II. 5. Tests antimicrobiens de la leucocine KM432Bz (5 µl, 10 µM) **sur *Li. monocytogenes* EGDE *rpoN*$^+$ (A) et *rpoN*$^-$ (B)**.

III.3. Effet de la leucocine KM432Bz sur des biofilms

Un biofilm est formé de différents microorganismes vivants et morts adhérant entre eux et à une surface, englués dans une matrice adhésive et protectrice composée essentiellement de protéines, glycoprotéines, polysaccharides, de sels et d'eau. Selon les conditions environnementales, les biofilms peuvent s'organiser en couche monocellulaire ou devenir plus complexes et comporter des couches formées par différents microorganismes (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Les biofilms offrent une véritable protection pour les bactéries aboutissant ainsi à l'émergence de nombreuses résistances aux traitements physiques et chimiques conventionnels.

Les problèmes liés aux biofilms concernent différents domaines parmi lesquels la santé, le traitement des eaux, l'industrie agroalimentaire,… Dans le secteur alimentaire et en particulier laitier et fromager, la présence de biofilms formés par *Li. monocytogenes* (Wong, 1998) peut entraîner de sévères problèmes de santé publique (Carpentier et Cerf, 2011).

Dans ce contexte, nous avons examiné les capacités de la leucocine KM432Bz à inhiber les biofilms à deux niveaux, lors deleur formation et lorsqu'ils sont déjà constitués.

a. Effet de la leucocine KM432Bz sur la formation d'un biofilm

Afin d'étudier l'effet de la leucocine KM432Bz sur la formation de biofilm, les bactéries sensibles ont été cultivées en présence de bactériocine à 5 et 10 µM. Les puits contenant les cultures bactériennes ont ensuite été vidés, lavés puis colorés au Crystal violet. Les DO_{620nm} ont été mesurées afin de quantifier le biofilm formé. Ce test a révélé que la leucocine KM432Bz aux concentrations 5 et 10 µM inhibait la formation d'un biofilm par *Lb. sakei* subsp. *sakei* CIP 103139 et *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* CIP 102305. De plus, la bactériocine à la concentration 10 µM inhibait la formation d'un biofilm par *Li. monocytogenes* EGDE (**Figure II. 6**). En revanche, la leucocine KM432Bz n'a aucun effet réellement significatif sur la formation de biofilms par les autres bactéries qui lui sont sensibles, à savoir *Li. monocytogenes* CIP 80.110 et surtout *Li. innocua* CIP 80.11 qui y est totalement insensible (**Figure II. 6**).

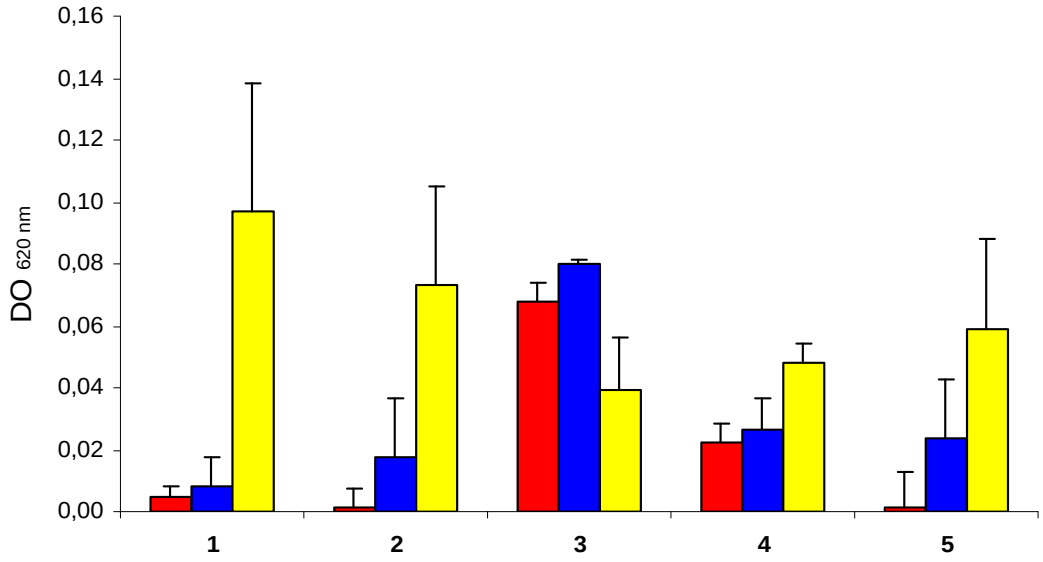


Figure II. 6. Effet de la leucocine KM432Bz à 10 (■) et 5 µM (■) sur la formation d'un biofilm par *Lb. sakei* subsp. *sakei* CIP 103139 (**1**); *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* CIP 102305 (**2**); *Li. innocua* CIP 80.11 (**3**); *Li. monocytogenes* CIP 80.110 (**4**) et *Li. monocytogenes* EGDE (**5**). Le contrôle sans bactériocine pour chaque bactérie est présenté en ■ sur les diagrammes.

b. Effet de la leucocine KM432Bz sur un biofilm préformé

Pour vérifier l'effet de la leucocine KM432Bz sur un biofilm préformé, la bactériocine à 5 et 10 µM a été ajoutée a une culture bactérienne à une DO_{620nm} égale à 0,2. Les puits

contenant les cultures bactériennes ont ensuite été vidés, lavés puis colorés au Crystal violet. Les DO_{620nm} ont été mesurées afin de quantifier le biofilm formé. Seuls les biofilms formés par *Lb. sakei* subsp. *sakei* CIP 103139 et *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* CIP 102305 sont sensibles à l'effet antimicrobien de la leucocine KM432Bz à 5 et 10 µM (**Figure II. 7**).

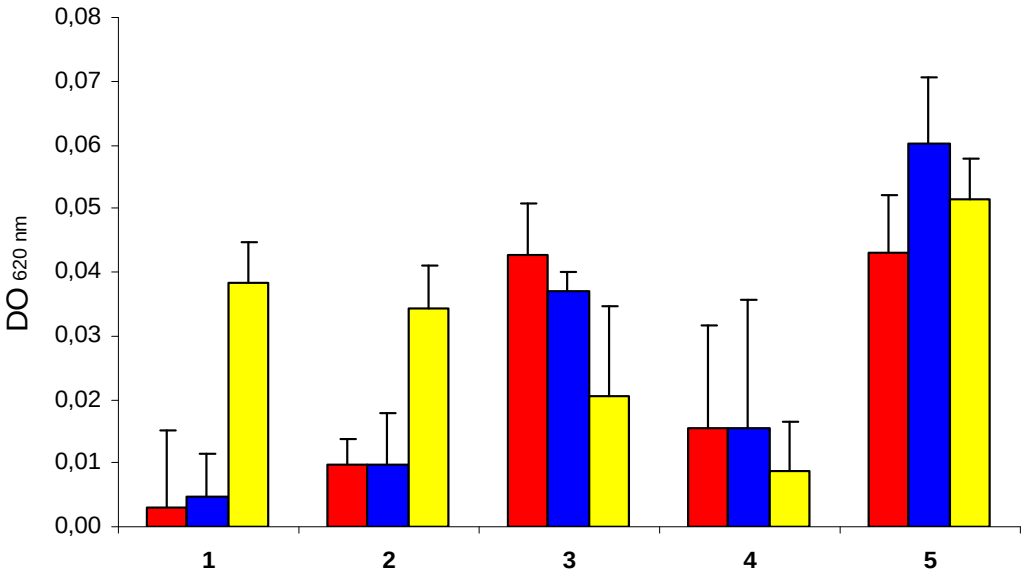


Figure II. 7. Effet de la leucocine KM432Bz à 10 (■) et 5 µM (■) sur un biofilm préfomé par *Lb. sakei* subsp. *sakei* CIP 103139 (**1**); *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* CIP 102305 (**2**); *Li. innocua* CIP 80.11 (**3**); *Li. monocytogenes* CIP 80.110 (**4**) et *Li. monocytogenes* EGDE (**5**). Le contrôle sans bactériocine pour chaque bactérie est présenté en ■ sur les diagrammes.

→ La leucocine KM432Bz inhibe la formation de biofilms par deux souches phylogénétiquement proches de la souche productrice à savoir *Lb. sakei* subsp. *sakei* CIP 103139 et *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* CIP 102305 ainsi que par un pathogène *Li. monocytogenes* CIP 80.110. En revanche, elle est seulement active contre les biofilms préformés par *Lb. sakei* subsp. *sakei* CIP 103139 et *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* CIP 102305.

III.4. Recherche du gène codant le précurseur de la leucocine KM432Bz chez d'autres espèces de Leuconostoc

Afin de vérifier la présence (ou non) du gène codant la précurseur de la leucocine KM432Bz chez d'autres espèces du genre *Leuconostoc* nous avons d'abord soumis quelques espèces de *Leuconostoc* à des tests antimicrobiens en utilisant la leucocine KM432Bz (5 µl,

10 µM) puis vérifié, par PCR, la présence ou l'absence du gène codant le précurseur de la bactériocine chez l'ensemble des espèces de *Leuconostoc* testées.

Le test antimicrobien révèle la résistance de trois espèces à savoir *Ln. carnosum* CIP 103319, *Ln. citreum* CIP 103315 et *Ln. gelidum* CIP 103318. Cette résistance semble montrer que ces espèces sont immunisées contre la leucocine KM432Bz. Par contre, la leucocine KM432Bz est inactive contre *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* CIP 102423, *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* CIP 102305 et *Ln. pseudomesenteroides* CIP 103316. La résistance de la souche productrice *Ln. pseudomesenteroides* KM432Bz à sa propre bactériocine confirme son immunité à sa propre production (**Table 1**, publication).

La recherche du gène codant le précurseur de la bactériocine chez ces différentes souches a été réalisée. Pour cela, un fragment du gène codant la leucocine KM432Bz a été amplifié par PCR en utilisant des amorce spécifiques (PréleuB-F et PréleuB-R, **Table 2**, publication) chez les différentes espèces de *Leuconostoc* y compris chez la bactérie productrice *Ln. pseudomesenteroides* (contrôle positif).
Toutes les bactéries testées montrent la présence d'un amplicon du fragment du gène codant le précurseur de la leucocine KM432Bz d'environ 178 pb (**Figure II. 8**).

Les bactéries immunisées à une bactériocine sont généralement porteuses d'un gène codant une protéine d'immunité à l'origine de cette résistance. Dans la plupart des cas, le gène codant la protéine d'immunité se trouve en aval du gène codant le précurseur de la bactériocine sur une même unité de transcription (Ennahar *et al.*, 2000). Or, notre étude révèle que même les bactéries sensibles semblent porter le gène codant le précurseur de la bactériocine. Différentes hypothèses sont possibles : soit le gène codant le précurseur de la bactériocine est transféré seul, soit toute l'unité de transcription (gène codant le précurseur de la bactériocine + gène codant la protéine d'immunité) est tranférée mais pas exprimée chez la bactéries réceptrice (possibilité d'un promoteur différent ?).

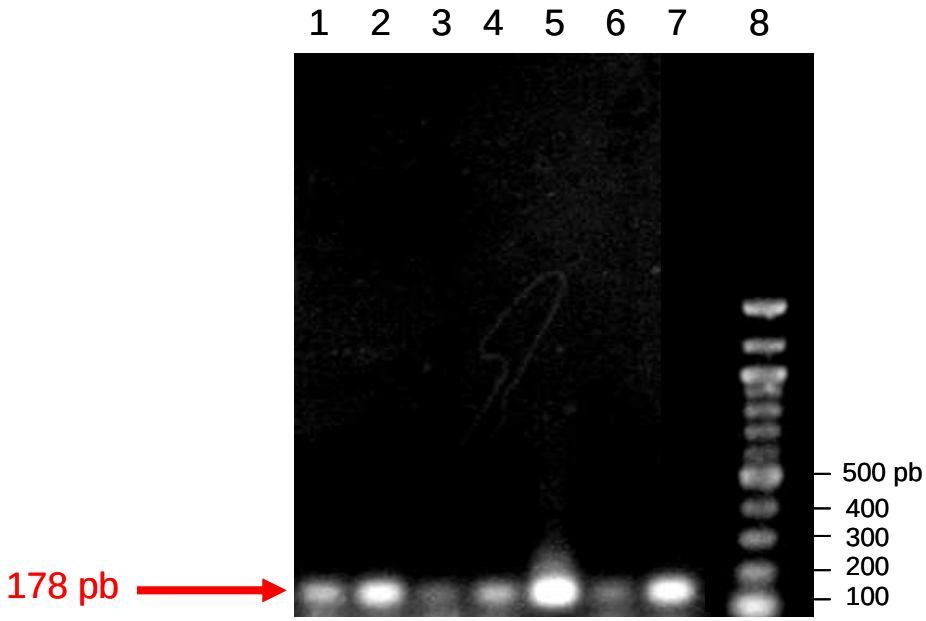


Figure II. 8. Gel d'agarose des produits PCR obtenu en utilisant des amorces spécifiques pour amplifier un fragment du gène codant le précurseur de la leucocine KM432Bz à partir de matrices correspondant aux ADN génomiques de *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* CIP 102305 (**1**); *Ln. carnosum* CIP 103319 (**2**); *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* CIP 102423 (**3**); *Ln. citreum* CIP 103315 (**4**); *Ln. pseudomesenteroides* CIP 103316 (**5**); *Ln. gelidum* CIP 103318 (**6**); *Ln. pseudomesenteroides* KM432Bz (**7**, côntrole positif). La piste **8** correspond au marqueur de poids moléculaire 100 pb (*NEB*).

Discussion générale, conclusions et perspectives

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis des millénaires pour la fermentation de produits alimentaires par différentes populations. En plus de leurs propriétés de fermentation, de résistance aux variations de pH et aux températures élevées, la propriété de bioconservation leur a été attribuée. Les métabolites responsables d'activités antimicrobiennes dirigées contre des pathogènes de l'alimentation comme *Listeria*, *Enterococcus* et *Salmonella* s'avèrent être à l'origine de cette propriété de bioconservation. Parmi ces métabolites, on trouve l'acide lactique et des peptides antimicrobiens appelés bactériocines. La nisine est utilisée depuis 40 ans comme conservateur alimentaire dans plus de 80 pays. Plus récemment, la pédiocine a également été commercialisée comme conservateur alimentaire. Les études portant sur des bactériocines sont toujours en cours afin de mieux comprendre leur structure et leurs modes d'actions pour élargir leurs applications.

Nous avons choisi d'isoler une bactériocine produite par une bactérie lactique isolée d'une boisson traditionnelle fermentée appelée boza. Cette boisson est consommée communément dans la région des Balkans et connue pour sa bonne conservation à température ambiante. Pour cela la souche bactérienne productrice a d'abord été isolée puis identifiée comme un *Ln. pseudomesenteroides* et nommée KM432Bz. Différentes étapes de purification ont été entreprises afin d'isoler la bactériocine produite. Une fois la bactériocine purifiée, un séquençage peptidique combinant des analyses par spectrométrie de masse et par dégradation d'Edman a été réalisé afin de déterminer la structure primaire du peptide. Les résultats obtenus ont montré que la séquence en acides aminés de la leucocine KM432Bz est identique à celle de trois bactériocines de classe IIa, les leucocine A, B et A-QU15 produites respectivement par *Ln. gelidum*, *Ln. carnosum* et *Ln. pseudomesenteroides*. Les leucocine B et A-QU15 sont identiques et se différencient de la leucocine A uniquement par la séquence spécifique à leur précurseur.

Afin de vérifier ce résultat, des études du système génétique impliqué dans la biosynthèse de cette bactériocine ont été réalisées. Le séquençage nucléotidique a confirmé que le gène codant le précurseur de la leucocine KM432Bz présentait la même séquence nucléotidique que celui codant la leucocine B/ A-QU15. Les gènes codant la protéine d'immunité, l'ABC transporteur ainsi qu'une partie de la protéine accessoire ont été

caractérisés et partagent 96% de similarité avec ceux relatifs à la leucocine A, le système génétique spécifique de la leucocine B n'ayant pas été identifié en entier. La leucocine KM432Bz est donc une bactériocine produite par une souche de *Ln. pseudomesenteroides* et est identique à la leucocine A-QU15 décrite par Sawa *et al.* (Sawa *et al.*, 2010). Il a déjà été montré que le système génétique impliqué dans la biosynthèse des bactériocines produites par *Leuconostoc* sp. est entouré de séquences inversées répétées (IS) et subirait des transferts horizontaux inter-espèce (Johansen & Kibenich, 1992). Les transferts horizontaux inter-bactéries étant des phénomènes courants chez les bactéries et en particulier chez le genre *Leuconostoc* (Johansen & Kibenich, 1992), ceci pourrait être le cas de notre bactériocine. En effet, ces observations laisseraient penser qu'un même cluster de gènes aurait pu subir des modifications génétiques au cours de l'évolution (transferts génétiques) et former ainsi différents clusters aujourd'hui codant la même bactériocine ou des bactériocines différentes retrouvées chez des espèces bactériennes différentes.

Pour étudier cette hypothèse, des fragments de gènes codant la bactériocine d'intérêt ont été amplifiés chez différentes espèces de *Leuconostoc*, à savoir *Ln. carnosum* CIP 103319, *Ln. citreum* CIP 103315, *Ln. gelidum* CIP 103318, *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* CIP 102423, *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* CIP 102305 et *Ln. pseudomesenteroides* CIP 103316. Toutes les souches bactériennes testées se sont avérées être porteuses du gène codant le précurseur de la leucocine KM432Bz. En revanche les tests antimicrobiens réalisés sur ces mêmes souches ont montré que seules les souches *Ln. carnosum* et *Ln. gelidum* étaient résistantes à la bactériocine produite par la souche KM432Bz. La résistance de la souche productrice *Ln. pseudomesenteroides* KM432Bz à sa propre toxine confirme son immunité.

Par ailleurs, aucun produit d'amplification correspondant à la zone intergénique séparant le groupe de gènes impliqué dans la production du précurseur de la bactériocine et la protéine d'immunité de celui impliqué dans l'export de la bactériocine n'a été obtenu par PCR. Ces deux groupes de gènes ne se trouveraient donc pas l'un à coté de l'autre contrairement au cas de la leucocine A. Ils pourraient donc être situés soit sur un même plasmide et séparés par d'autres entités génétiques, soit sur des plasmides différents.

De façon générale, les spectres d'activité réalisés pour des bactériocines révèlent une sensibilité de bactéries à Gram positif, en particulier de souches phylogénétiquement proches de la bactérie productrice de cette bactériocine. Nous avons déterminé le spectre d'activité de la leucocine KM432Bz en la testant sur gélose contre des bactéries phylogénétiquement proches incluant des pathogènes, puis en mesurant la CMI sur les souches sensibles

identifiées. La leucocine KM432Bz est active contre de nombreuses souches phylogénétiquement proches appartenant aux genres *Leuconostoc* parmi lesquelles *Ln. mesenteroides, Ln. lactis, Ln. pseudomesenteroides* et au genre *Lactobacillus* comme *Lb. sakei*. Elle est également active contre des bactéries pathogènes comme *Str. pneumoniae, En. faecalis, Li. monocytogenes* et *Li. innocua*, les deux dernières étant responsables d'infections respectivement chez l'Homme et l'animal. Les CMIs retrouvées sur les bactéries sensibles sont comprises entre 0,08 et 10 µM avec une CMI de 156 nM pour *Li. monocytogenes*. De plus, des tests réalisés sur la croissance de *Lb. sakei* subsp. *sakei* et *Li. monocytogenes* ont montré que la bactériocine exerçait un effet bactéricide sur *Lb. sakei* subsp. *sakei* et bactériostatique sur *Li. monocytogenes*.
En revanche, toutes les bactéries à Gram négatif testées sont résistantes à la leucocine KM432Bz. Jusqu'à présent, aucune bactériocine de classe IIa n'a exprimé d'activité antimicrobienne contre les bactéries à Gram négatif. Les bactéries à Gram négatif possèdent, en effet, une membrane externe qui empêche vraisemblablement les bactériocines de classe IIa d'atteindre leur cible.

La plupart des bactériocines ont pour cible la membrane cytoplasmique des bactéries à Gram positif dans laquelle elles induisent la formation de pores aboutissant à la fuite de molécules intracellulaires. Toutefois, la nature de ces molécules dépend du type de pores formés. Plus particulièrement, les bactériocines de classe IIa induisent, dans la plus part des cas, la formation de pores dans la membrane cytoplasmique de la bactérie cible provoquant la fuite d'ions et de petites molécules intracellulaires aboutissant ainsi à la mort de la bactérie. Il a été montré que les bactériocines de classe IIa nécessitaient la présence d'une mannose perméase du système phosphotransférase (E^t_{Man}) chez la bactérie cible qu'elles utilisent comme « docking molecule » pour la formation de pores lors de leur interaction avec la membrane cytoplasmique (Dalet *et al.*, 2001, Diep *et al.*, 2009). Pour vérifier le rôle de cette protéine dans le mécanisme d'action de la leucocine KM432Bz, nous l'avons testée sur des souches de *Li. monocytogenes* (*rpoN*$^-$) mutées sur le gène codant le facteur de transcription σ^{54} (Dalet *et al.*, 2000, Dalet *et al.*, 2001, Héchard *et al.*, 2001). Les souches mutées sont résistantes à la bactériocine, confirmant ainsi l'implication de E^t_{Man} dans le mode d'action de la bactériocine produite par *Ln. pseudomesenteroides* KM432Bz. Ce résultat confirme bien la nécessité de la présence de E^t_{Man} chez les bactériocines de classe IIa.

La leucocine KM432Bz produite par *Ln. pseudomesenteroides* KM432Bz est une leucocine B/ A-QU15 de classe IIa active contre des pathogènes majeurs à l'origine d'infections chez l'Homme et l'animal. La leucocine B est produite par une autre espèce du genre *Leuconostoc*, à savoir *Ln. carnosum*. Sa capacité de production par *Ln. pseudomesenteroides* aurait pu être acquise (ou inversement) lors d'un transfert horizontal de gènes inter-espèce entre ces différentes espèces bactériennes. En effet, ce transfert génétique horizontal pourrait amener différentes espèces appartenant en l'occurrence au genre *Leuconostoc* à produire la même bactériocine ou des bactériocines similaires. Ces observations laisseraient penser également qu'un même cluster de gènes aurait pu subir des modifications génétiques au cours de l'évolution (transferts génétiques) et former ainsi différents clusters codant aujourd'hui différentes bactériocines. Quant aux résistances observées pour des souches renfermant le gène codant la leucocine KM432Bz, elles pourraient être dues soit à la mutation du gène codant la protéine d'immunité, soit à son absence totale, soit à une déficience en mannose perméase du système phosphotransférase E^{t}_{Man}. Ce résultat suggère également que des mutations seraient apparues sur le gène codant la protéine d'immunité chez les autres espèces testées, ce qui expliquerait leur sensibilité à la bactériocine. Enfin, la résistance pourrait aussi être due à une déficience en mannose perméase chez les souches résistantes. En effet, il serait judicieux d'amplifier par PCR grâce à des amorces spécifiques le gène codant la protéine d'immunité chez les souches résistantes afin de vérifier sa présence ou son absence. Le séquençage du (des) fragment(s) obtenu(s) nous permettrait de comparer sa (leur) séquence avec celle de la leucocine KM432Bz. Le résultat obtenu pourrait nous éclairer quant à la résistance de ces souches à cette bactériocine.

La détermination des CMIs de la leucocine KM432Bz a permis de quantifier son activité antimicrobienne. Nous avons mesuré les CMIs de la leucocine KM432Bz en parallèle de celles de la pédiocine AcH (Motlagh *et al.*, 1994) commerciale afin de comparer son activité antimicrobienne à celle d'une bactériocine apparentée (classe IIa) connue, utilisée comme conservateur alimentaire. La leucocine KM432Bz s'est révélée être active contre un nombre d'espèces bactériennes impliquées dans l'apparition d'infections parmi lesquelles *Li. innocua* et *Li. monocytogenes*. De plus, la leucocine KM432Bz est active contre ces deux bactéries pathogènes avec des CMIs respectivement égales à 0,625 et 0,156 µM contre 2,5 et 5 µM pour la pédiocine AcH (voir **publication**). La leucocine KM432Bz est plus active que la pédiocine déjà commercialisée sous le nom d'Alta® pour la conservation des saucisses, ce qui pourrait la placer comme un bon candidat en tant que conservateur alimentaire.

De nombreuses études seront à faire pour confirmer ce point, comme des tests d'innocuité, de toxicité,… De plus, il serait intéressant d'élargir le spectre d'activité en testant la leucocine KM432Bz contre d'autres pathogènes responsables d'infections tels que *Cl. botulinum*, *Cl. perfringens* et *Salmonella enterica*.

Bibliographie

A

Abee, T., Klaenhammer, T. R., and Letellier, L. (1994) Kinetic studies of the action of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane. *Appl Environ Microbiol*.***60***: 1006-1013.

Abee, T., Krockel, L., and Hill, C. (1995) Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int J Food Microbiol*.***28***: 169-185.

Adams, M. R., and Marteau, P. (1995) On the safety of lactic acid bacteria from food. *Int J Food Microbiol*.***27***: 263-264.

Aguirre, M., and Collins, M. D. (1993) Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J Appl Bacteriol*.***75***: 95-107.

Ahn, C., and Stiles, M. E. (1990) Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged meats. *J. Appl. Bacteriol*.***69***: 302-310.

Al-Holy, M., Quinde, Z., Guan, D., Tang, J., and Rasco, B. (2004) Thermal inactivation of *Listeria innocua* in salmon (*Oncorhynchus keta*) caviar using conventional glass and novel aluminum thermal-death-time tubes. *J Food Prot*.***67***: 383-386.

Allison, G. E., Fremaux, C., and Klaenhammer, T. R. (1994) Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the lactacin F operon. *J Bacteriol*.***176***: 2235-2241.

Altena, K., Guder, A., Cramer, C., and Bierbaum, G. (2000) Biosynthesis of the lantibiotic mersacidin: organization of a type B lantibiotic gene cluster. *Appl Environ Microbiol*.***66***: 2565-2571.

Ananou, S., Galvez, A., Martinez-Bueno, M., Maqueda, M., and Valdivia, E. (2005) Synergistic effect of enterocin AS-48 in combination with outer membrane permeabilizing treatments against *Escherichia coli* O157:H7. *J Appl Microbiol*.***99***: 1364-1372.

Ananou, S., Munoz, A., Martinez-Bueno, M., Gonzalez-Tello, P., Galvez, A., Maqueda, M., and Valdivia, E. (2010) Evaluation of an enterocin AS-48 enriched bioactive powder obtained by spray drying. *Food Microbiol*.***27***: 58-63.

Anderson, D. G., and McKay, L. L. (1983) Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic *streptococci*. *Appl Environ Microbiol*.***46***: 549-552.

Anderssen, E. L., Diep, D. B., Nes, I. F., Eijsink, V. G., and Nissen-Meyer, J. (1998) Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Appl Environ Microbiol*.***64***: 2269-2272.

Arakawa, K., Kawai, Y., Ito, Y., Nakamura, K., Chujo, T., Nishimura, J., Kitazawa, H., and Saito, T. (2010) HPLC purification and re-evaluation of chemical identity of two circular bacteriocins, gassericin A and reutericin 6. *Lett Appl Microbiol*.***50***: 406-411.

Asaduzzaman, S. M., Nagao, J., Aso, Y., Nakayama, J., and Sonomoto, K. (2006) Lysine-oriented charges trigger the membrane binding and activity of nukacin ISK-1. *Appl Environ Microbiol*.***72***: 6012-6017.

Asaduzzaman, S. M., and Sonomoto, K. (2009) Lantibiotics: diverse activities and unique modes of action. *J Biosci Bioeng*.***107***: 475-487.

Aso, Y., Sashihara, T., Nagao, J., Kanemasa, Y., Koga, H., Hashimoto, T., Higuchi, T., Adachi, A., Nomiyama, H., Ishizaki, A., Nakayama, J., and Sonomoto, K. (2004a) Characterization of a gene cluster of *Staphylococcus warneri* ISK-1 encoding the biosynthesis of and immunity to the lantibiotic, nukacin ISK-1. *Biosci Biotechnol Biochem*.***68***: 1663-1671.

Atrih, A., and Foster, S. J. (2001a) Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance properties and demonstration of its conservation amongst species. *J Appl Microbiol*.***91***: 364-372.

Atrih, A., Rekhif, N., Moir, A. J., Lebrihi, A., and Lefebvre, G. (2001b) Mode of action, purification and amino acid sequence of plantaricin C19, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. *Int J Food Microbiol*.***68***: 93-104.

Björkroth, J., and Holzapfel, W. (2006) Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. (Eds). *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community (3rd edition)*. Springer Verlag. New York, USA. pp 267-319.

Axelsson, L., and Holck, A. (1995) The genes involved in production of and immunity to sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J Bacteriol*.***177***: 2125-2137.

Axelsson, L. (2004) Classification and physiology. In: Salsinen, S., Wright, A.V., Ouwehand, A. (Eds). *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects (3ed edition)*. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. vol. 633, 1 - 66.

Aymerich, T., Holo, H., Håvarstein, L. S., Hugas, M., Garriga, M., and Nes, I. F. (1996) Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl Environ Microbiol*.***62***: 1676-1682.

B

Babasaki, K., Takao, T., Shimonishi, Y., and Kurahashi, K. (1985) Subtilosin A, a new antibiotic peptide produced by *Bacillus subtilis* 168: isolation, structural analysis, and biogenesis. *J Biochem*.***98***: 585-603.

Balla, E., Dicks, L. M., Du Toit, M., Van Der Merwe, M. J., and Holzapfel, W. H. (2000) Characterization and cloning of the genes encoding enterocin 1071A and enterocin 1071B, two antimicrobial peptides produced by *Enterococcus faecalis* BFE 1071. *Appl Environ Microbiol*.***66***: 1298-1304.

Banerjee, S., and Hansen, J. N. (1988) Structure and expression of a gene encoding the precursor of subtilin, a small protein antibiotic. *J Biol Chem*.***263***: 9508-9514.

Barbés, C., and Boris, S. (1999) Potential role of lactobacilli as prophylactic agents against genital pathogens. *AIDS Patient Care STDS*.***13***: 747-751.

Barrett, E., Hayes, M., O'Connor, P., Gardiner, G., Fitzgerald, G. F., Stanton, C., Ross, R. P., and Hill, C. (2007) Salivaricin P, one of a family of two-component antilisterial bacteriocins produced by intestinal isolates of *Lactobacillus salivarius*. *Appl Environ Microbiol*.***73***: 3719-3723.

Bartlett, D., Ferriera, S., Johnson, J., Kravitz, S., Beeson, K., Sutton, G., Rogers, Y.-H., Friedman, R., Frazier, M., and Venter, J. C. (2007) *Carnobacterium* sp. AT7, whole genome shotgun sequence. *J Craig Venter Institute, 9704 Medical Center Drive, Rockville, MD 20850, USA*.***bases 1 to 2442118***.

Belguesmia, Y., Naghmouchi, K., Chihib, N.-E., and Drider, D. (2011) Class IIa bacteriocins: current knowledge and perspectives. In: Drider, D., and Rebuffat, S. (Eds). *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer Verlag. Nantes, France. pp 1-41.

Bennik, M. H., Vanloo, B., Brasseur, R., Gorris, L. G., and Smid, E. J. (1998) A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated *Enterococcus mundtii*: full characterization and interaction with target organisms. *Biochim Biophys Acta*.***1373***: 47-58.

Bierbaum, G., and Sahl, H. G. (2009) Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Curr Pharm Biotechnol*.***10***: 2-18.

Birri, D. J., Brede, D. A., Forberg, T., Holo, H., and Nes, I. F. (2010) Molecular and genetic characterization of a novel bacteriocin locus in *Enterococcus avium* isolates from infants. *Appl Environ Microbiol*.***76***: 483-492.

Björkroth, J., and Holzapfel, W. (2006) Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. (Eds). *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community (3rd edition).* Springer Verlag. New York, USA. pp 267-319.

Black, E. P., Koziol-Dube, K., Guan, D., Wei, J., Setlow, B., Cortezzo, D. E., Hoover, D. G., and Setlow, P. (2005) Factors influencing germination of *Bacillus subtilis* spores via activation of nutrient receptors by high pressure. *Appl Environ Microbiol*.***71***: 5879-5887.

Blaesse, M., Kupke, T., Huber, R., and Steinbacher, S. (2003) Structure of MrsD, an FAD-binding protein of the HFCD family. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*.***59***: 1414-1421.

Blom, H., Katla, T., Holck, A., Sletten, K., Axelsson, L., and Holo, H. (1999) Characterization, production, and purification of leucocin H, a two-peptide bacteriocin from *Leuconostoc* MF215B. *Curr Microbiol*.***39***: 43-48.

Bonelli, R. R., Schneider, T., Sahl, H. G., and Wiedemann, I. (2006) Insights into in vivo activities of lantibiotics from gallidermin and epidermin mode-of-action studies. *Antimicrob Agents Chemother*.***50***: 1449-1457.

Booth, M. C., Bogie, C. P., Sahl, H. G., Siezen, R. J., Hatter, K. L., and Gilmore, M. S. (1996) Structural analysis and proteolytic activation of *Enterococcus faecalis* cytolysin, a novel lantibiotic. *Mol Microbiol*.***21***: 1175-1184.

Borrero, J., Brede, D. A., Skaugen, M., Diep, D. B., Herranz, C., Nes, I. F., Cintas, L. M., and Hernandez, P. E. (2011) Characterization of garvicin ML, a novel circular bacteriocin produced by *Lactococcus garvieae* DCC43, isolated from mallard ducks (Anas platyrhynchos). *Appl Environ Microbiol*.***77***: 369-373.

Bradley, A. (2002) Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet J*.***164***: 116-128.

Breukink, E., van Kraaij, C., Demel, R. A., Siezen, R. J., Kuipers, O. P., and de Kruijff, B. (1997) The C-terminal region of nisin is responsible for the initial interaction of nisin with the target membrane. *Biochemistry*.***36***: 6968-6976.

Breukink, E., Wiedemann, I., van Kraaij, C., Kuipers, O. P., Sahl, H., and de Kruijff, B. (1999) Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science*.***286***: 2361-2364.

Breukink, E., van Heusden, H. E., Vollmerhaus, P. J., Swiezewska, E., Brunner, L., Walker, S., Heck, A. J., and de Kruijff, B. (2003) Lipid II is an intrinsic component of the pore induced by nisin in bacterial membranes. *J Biol Chem*.***278***: 19898-19903.

Breukink, E., and de Kruijff, B. (2006) Lipid II as a target for antibiotics. *Nat Rev Drug Discov*.***5***: 321-332.

Broadbent, J. R., Chou, Y. C., Gillies, K., and Kondo, J. K. (1989) Nisin inhibits several gram-positive, mastitis-causing pathogens. *J Dairy Sci*.***72***: 3342-3345.

Brogden, K. A. (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*.***3***: 238-250.

Brötz, H., Bierbaum, G., Markus, A., Molitor, E., and Sahl, H. G. (1995) Mode of action of the lantibiotic mersacidin: inhibition of peptidoglycan biosynthesis via a novel mechanism? *Antimicrob Agents Chemother*.***39***: 714-719.

Brötz, H., Bierbaum, G., Reynolds, P. E., and Sahl, H. G. (1997) The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan biosynthesis at the level of transglycosylation. *Eur J Biochem*.***246***: 193-199.

Brötz, H., Bierbaum, G., Leopold, K., Reynolds, P. E., and Sahl, H. G. (1998a) The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. *Antimicrob Agents Chemother*.***42***: 154-160.

Brötz, H., Josten, M., Wiedemann, I., Schneider, U., Gotz, F., Bierbaum, G., and Sahl, H. G. (1998b) Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Mol Microbiol*.***30***: 317-327.

Buchman, G. W., Banerjee, S., and Hansen, J. N. (1988) Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. *J Biol Chem*.***263***: 16260-16266.

Budde, B. B., Hornbaek, T., Jacobsen, T., Barkholt, V., and Koch, A. G. (2003) *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments. *Int J Food Microbiol*.***83***: 171-184.

C

Callanan, M., Kaleta, P., O'Callaghan, J., O'Sullivan, O., Jordan, K., McAuliffe, O., Sangrador-Vegas, A., Slattery, L., Fitzgerald, G. F., Beresford, T., and Ross, R. P. (2008) Genome sequence of *Lactobacillus helveticus*, an organism distinguished by selective gene loss and insertion sequence element expansion. *J Bacteriol*.***190***: 727-735.

Carpentier, B., and Cerf, O. (2011) Persistence of Liseria monocytogenes in food industry equipment and premises. *Int J Food Microbiol*.***145***: 1-8.

Casaus, P., Nilsen, T., Cintas, L. M., Nes, I. F., Hernandez, P. E., and Holo, H. (1997) Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology*.***143 (Pt 7)***: 2287-2294.

Castellano, P., Raya, R., and Vignolo, G. (2003) Mode of action of lactocin 705, a two-component bacteriocin from *Lactobacillus casei* CRL705. *Int J Food Microbiol*.***85***: 35-43.

Chaillou, S., Champomier-Verges, M. C., Cornet, M., Crutz-Le Coq, A. M., Dudez, A. M., Martin, V., Beaufils, S., Darbon-Rongere, E., Bossy, R., Loux, V., and Zagorec, M. (2005) The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. *Nat Biotechnol*.***23***: 1527-1533.

Chang, J. Y., Lee, H. J., and Chang, H. C. (2007) Identification of the agent from *Lactobacillus plantarum* KFRI464 that enhances bacteriocin production by *Leuconostoc citreum* GJ7. *J Appl Microbiol*.***103***: 2504-2515.

Chatterjee, C., Paul, M., Xie, L., and van der Donk, W. A. (2005a) Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chem Rev*.***105***: 633-684.

Chatterjee, C., Miller, L. M., Leung, Y. L., Xie, L., Yi, M., Kelleher, N. L., and van der Donk, W. A. (2005b) Lacticin 481 synthetase phosphorylates its substrate during lantibiotic production. *J Am Chem Soc*.***127***: 15332-15333.

Chatterjee, S., Chatterjee, D. K., Jani, R. H., Blumbach, J., Ganguli, B. N., Klesel, N., Limbert, M., and Seibert, G. (1992) Mersacidin, a new antibiotic from *Bacillus* in vitro and in vivo antibacterial activity. *J Antibiot (Tokyo)*.***45***: 839-845.

Chen, Y., Shapira, R., Eisenstein, M., and Montville, T. J. (1997a) Functional characterization of pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a predicted tertiary structure. *Appl Environ Microbiol*.***63***: 524-531.

Chen, Y., Ludescher, R. D., and Montville, T. J. (1997b) Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. *Appl Environ Microbiol*.***63***: 4770-4777.

Chihib, N. E., and Tholozan, J. L. (1999) Effect of rapid cooling and acidic pH on cellular homeostasis of *Pectinatus frisingensis*, a strictly anaerobic beer-spoilage bacterium. *Int J Food Microbiol*.***48***: 191-202.

Chikindas, M. L., García-Garcerá, M. J., Driessen, A. J., Ledeboer, A. M., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., Abee, T., Konings, W. N., and Venema, G. (1993) Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Appl Environ Microbiol*.***59***: 3577-3584.

Choi, H. J., Lee, H. S., Her, S., Oh, D. H., and Yoon, S. S. (1999) Partial characterization and cloning of leuconocin J, a bacteriocin produced by *Leuconostoc* sp. J2 isolated from the Korean fermented vegetable Kimchi. *J Appl Microbiol*.***86***: 175-181.

Chung, K. T., Dickson, J. S., and Crouse, J. D. (1989) Effects of nisin on growth of bacteria attached to meat. *Appl Environ Microbiol*.***55***: 1329-1333.

Cintas, L. M., Casaus, P., Havarstein, L. S., Hernandez, P. E., and Nes, I. F. (1997) Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl Environ Microbiol*.***63***: 4321-4330.

Cintas, L. M., Casaus, P., Holo, H., Hernandez, P. E., Nes, I. F., and Håvarstein, L. S. (1998) Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J Bacteriol*.***180***: 1988-1994.

Cintas, L. M., Casaus, P., Herranz, C., Håvarstein, L. S., Holo, H., Hernandez, P. E., and Nes, I. F. (2000) Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J Bacteriol*.***182***: 6806-6814.

Claesson, M. J., Li, Y., Leahy, S., Canchaya, C., van Pijkeren, J. P., Cerdeno-Tarraga, A. M., Parkhill, J., Flynn, S., O'Sullivan, G. C., Collins, J. K., Higgins, D., Shanahan, F., Fitzgerald, G. F., van Sinderen, D., and O'Toole, P. W. (2006) Multireplicon genome architecture of *Lactobacillus salivarius*. *Proc Natl Acad Sci U S A*.***103***: 6718-6723.

Colas, J. C., Shi, W., Rao, V. S., Omri, A., Mozafari, M. R., and Singh, H. (2007) Microscopical investigations of nisin-loaded nanoliposomes prepared by Mozafari method and their bacterial targeting. *Micron*. .***38***: 841-847.

Colwell, R. R. (1970) Polyphasic taxonomy of the genus vibrio: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *J Bacteriol*.***104***: 410-433.

Cooper, L. E., McClerren, A. L., Chary, A., and van der Donk, W. A. (2008) Structure-activity relationship studies of the two-component lantibiotic haloduracin. *Chem Biol*.***15***: 1035-1045.

Copeland, A., Lucas, S., Lapidus, A., Barry, K., Detter, J. C., Glavina del Rio, T., Hammon, N., Israni, S., Dalin, E., Tice, H., Pitluck, S., Goltsman, E., Schmutz, J., Larimer, F., Land, M., Hauser, L., Kyrpides, N., Kim, E., Walter, J., Heng, N. C. K., Tannock, G. W., and Richardson, P. (2007) Complete sequence of chromosome of *Lactobacillus reuteri* DSM 20016. *US DOE Joint Genome Institute*.***bases 1 to 1999618***.

Corr, S. C., Li, Y., Riedel, C. U., O'Toole, P. W., Hill, C., and Gahan, C. G. (2007) Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proc Natl Acad Sci U S A*.***104***: 7617-7621.

Corsetti, A., Gobbetti, M., Rossi, J., and Damiani, P. (1998) Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Appl Microbiol Biotechnol*.***50***: 253-256.

Cotter, P. D., Hill, C., and Ross, R. P. (2005a) Bacterial lantibiotics: strategies to improve therapeutic potential. *Curr Protein Pept Sci*.***6***: 61-75.

Cotter, P. D., Hill, C., and Ross, R. P. (2005b) Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol*.***3***: 777-788.

Coventry, M. J., Gordon, J. B., Alexander, M., Hickey, M. W., and Wan, J. (1996) A food-grade process for isolation and partial purification of bacteriocins of lactic acid bacteria that uses diatomite calcium silicate. *Applied and Environmental Microbiology*.***62***: 1764-1769.

Criado, R., Diep, D. B., Aakra, A., Gutierrez, J., Nes, I. F., Hernandez, P. E., and Cintas, L. M. (2006) Complete sequence of the enterocin Q-encoding plasmid pCIZ2 from the multiple bacteriocin producer *Enterococcus faecium* L50 and genetic characterization of enterocin Q production and immunity. *Appl Environ Microbiol*.***72***: 6653-6666.

Cuozzo, S. A., Sesma, F., Palacios, J. M., de Ruiz Holgado, A. P., and Raya, R. R. (2000) Identification and nucleotide sequence of genes involved in the synthesis of lactocin 705, a two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus casei* CRL 705. *FEMS Microbiol Lett*.***185***: 157-161.

Czuprynski, C. J., Faith, N. G., and Steinberg, H. (2002) Ability of the *Listeria monocytogenes* strain Scott A to cause systemic infection in mice infected by the intragastric route. *Appl Environ Microbiol*.***68***: 2893-2900.

D

Dagert, M., and Ehrlich, S. D. (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene*.***6***: 23-28.

Dalet, K., Briand, C., Cenatiempo, Y., and Héchard, Y. (2000) The *rpoN* gene of *Enterococcus faecalis* directs sensitivity to subclass IIa bacteriocins. *Curr Microbiol*.***41***: 441-443.

Dalet, K., Cenatiempo, Y., Cossart, P., and Héchard, Y. (2001) A sigma(54)-dependent PTS permease of the mannose family is responsible for sensitivity of *Listeria monocytogenes* to mesentericin Y105. *Microbiology*.***147***: 3263-3269.

Davies, E. A., and Delves-Broughton, J. (1999) Nisin. In: Robinson, R., Batt, C., and Patel, P. (Eds). *Encyclopedia of Food Microbiology*. Acad, Press. London, UK. pp 191-198.

de Ambrosini, V. M., Gonzalez, S., Perdigon, G., de Ruiz Holgado, A. P., and Oliver, G. (1996) Chemical composition of the cell wall of lactic acid bacteria and related species. *Chem Pharm Bull* ***44***: 2263-2267.

De Kwaadsteniet, M., Fraser, T., Van Reenen, C. A., and Dicks, L. M. (2006) Bacteriocin T8, a novel class IIa sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* T8, isolated from vaginal secretions of children infected with human immunodeficiency virus. *Appl Environ Microbiol*.***72***: 4761-4766.

de Oliveira, S. S., Nascimento, J. S., Povoa, D. C., de Araujo, S. A., Gamon, M. R., and Bastos, M. C. (1998) Genetic analysis of the bacteriocin-encoding plasmids pRJ6 and pRJ9 of *Staphylococcus aureus* by transposon mutagenesis and cloning of genes involved in bacteriocin production. *J Appl Microbiol*.***85***: 972-984.

de Ruyter, P. G., Kuipers, O. P., and de Vos, W. M. (1996) Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl Environ Microbiol*.***62***: 3662-3667.

de Vos, W. M., Kuipers, O. P., van der Meer, J. R., and Siezen, R. J. (1995) Maturation pathway of nisin and other lantibiotics: post-translationally modified antimicrobial peptides exported by gram-positive bacteria. *Mol Microbiol*.***17***: 427-437.

Deegan, L. H., Cotter, P. D., and Hill, C. (2006) Bacteriocins: biological tolls for bio-preservation and shelf-life extension. *Int Dairy J*.***16***: 1058-1071.

deHaseth, P. L., Lohman, T. M., Burgess, R. R., and Record, M. T., Jr. (1978) Nonspecific interactions of *Escherichia coli* RNA polymerase with native and denatured DNA:

differences in the binding behavior of core and holoenzyme. *Biochemistry*.***17***: 1612-1622.

del Campo, R., Tenorio, C., Jiménez-Díaz, R., Rubio, C., Gómez-Lus, R., Baquero, F., and Torres, C. (2001) Bacteriocin production in vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus* isolates of different origins. *Antimicrob Agents Chemother*.***45***: 905-912.

Dessart, S. R., and Steenson, L. R. (1995) Biotechnology of dairy *Leuconostoc*. In: Hui, Y. H., and Khatchatourians, G. G. (Eds). *Food Biotechnology: Micororganisms*. VCH. New York, USA. pp 665-702.

Dias, R. S., Bambirra, E. A., Silva, M. E., and Nicoli, J. R. (1995) Protective effect of *Saccharomyces boulardii* against the cholera toxin in rats. *Braz J Med Biol Res*.***28***: 323-325.

Diaz, M., Valdivia, E., Martinez-Bueno, M., Fernández, M., Soler-González, A. S., Ramírez-Rodrigo, H., and Maqueda, M. (2003) Characterization of a new operon, *as-48EFGH*, from the *as-48* gene cluster involved in immunity to enterocin AS-48. *Appl Environ Microbiol*.***69***: 1229-1236.

Dicks, L. M. T., Heunis, D. A., van Staden, D. A., Brand, A., Sutyak Noll, K., and Chinkindas, M. L. (2011) Medical and personal care applications of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. In: Drider, D., and Rebuffat, S. (Eds). *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer Verlag. Stellenbosch, South Africa. pp 391-421.

Diep, D. B., Havarstein, L. S., Nissen-Meyer, J., and Nes, I. F. (1994) The gene encoding plantaricin A, a bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* C11, is located on the same transcription unit as an agr-like regulatory system. *Appl Environ Microbiol*.***60***: 160-166.

Diep, D. B., Håvarstein, L. S., and Nes, I. F. (1995) A bacteriocin-like peptide induces bacteriocin synthesis in *Lactobacillus plantarum* C11. *Mol Microbiol*.***18***: 631-639.

Diep, D. B., Håvarstein, L. S., and Nes, I. F. (1996) Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *J Bacteriol*.***178***: 4472-4483.

Diep, D. B., Johnsborg, O., Risøen, P. A., and Nes, I. F. (2001) Evidence for dual functionality of the operon *plnABCD* in the regulation of bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum*. *Mol Microbiol*.***41***: 633-644.

Diep, D. B., and Nes, I. F. (2002) Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Curr Drug Targets*.***3***: 107-122.

Diep, D. B., Myhre, R., Johnsborg, O., Aakra, A., and Nes, I. F. (2003) Inducible bacteriocin production in *Lactobacillus* is regulated by differential expression of the pln operons and by two antagonizing response regulators, the activity of which is enhanced upon phosphorylation. *Mol Microbiol*.***47***: 483-494.

Diep, D. B., Godager, L., Brede, D., and Nes, I. F. (2006) Data mining and characterization of a novel pediocin-like bacteriocin system from the genome of *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745. *Microbiology*.***152***: 1649-1659.

Diep, D. B., Skaugen, M., Salehian, Z., Holo, H., and Nes, I. F. (2007) Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proc Natl Acad Sci U S A*.***104***: 2384-2389.

Diep, D. B., Straume, D., Kjos, M., Torres, C., and Nes, I. F. (2009) An overview of the mosaic bacteriocin pln loci from *Lactobacillus plantarum*. *Peptides*.***30***: 1562-1574.

Dițu, L. M., Chifiriuc, C., Lazăr, V., and Mihăescu, G. (2009) Implication of quorum sensing phenomenon in the expression of genes that code for bacteriocines in lactic bacteria. *Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol*.***54***: 147-166.

Donnet-Hughes, A., Rochat, F., Serrant, P., Aeschlimann, J. M., and Schiffrin, E. J. (1999) Modulation of nonspecific mechanisms of defense by lactic acid bacteria: effective dose. *J Dairy Sci*.***82***: 863-869.

Dorenbos, R., Stein, T., Kabel, J., Bruand, C., Bolhuis, A., Bron, S., Quax, W. J., and Van Dijl, J. M. (2002) Thiol-disulfide oxidoreductases are essential for the production of the lantibiotic sublancin 168. *J Biol Chem*.***277***: 16682-16688.

Dortu, C., and Thonart, P. (2009) Les bactériocines des bactéries lactiques : caractérsitiques et interets pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*.***13***: 143-154.

Drider, D., Fimland, G., Hechard, Y., McMullen, L. M., and Prevost, H. (2006) The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol Mol Biol Rev*.***70***: 564-582.

Driessen, A. J., van den Hooven, H. W., Kuiper, W., van de Kamp, M., Sahl, H. G., Konings, R. N., and Konings, W. N. (1995) Mechanistic studies of lantibiotic-induced permeabilization of phospholipid vesicles. *Biochemistry*.***34***: 1606-1614.

Dubnau, D. (1991) The regulation of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*.***5***: 11-18.

Duffy, J. J., and Geiduschek, E. P. (1975) RNA polymerase from phage SP01-infected and uninfected *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*.***250***: 4530-4541.

Dufour, A., Hindre, T., Haras, D., and Le Pennec, J. P. (2007) The biology of lantibiotics from the lacticin 481 group is coming of age. *FEMS Microbiol Rev*.***31***: 134-167.

Duwat, P., Sourice, S., Cesselin, B., Lamberet, G., Vido, K., Gaudu, P., Le Loir, Y., Violet, F., Loubiere, P., and Gruss, A. (2001) Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. *J Bacteriol*.***183***: 4509-4516.

E

EFFCA. (2011) European Food and Feed Cultures Association.

Eguchi, T., Kaminaka, K., Shima, J., Kawamoto, S., Mori, K., Choi, S. H., Doi, K., Ohmomo, S., and Ogata, S. (2001) Isolation and characterization of enterocin SE-K4 produced by thermophilic enterococci, *Enterococcus faecalis* K-4. *Biosci Biotechnol Biochem*.***65***: 247-253.

Eijsink, V. G., Skeie, M., Middelhoven, P. H., Brurberg, M. B., and Nes, I. F. (1998) Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol*.***64***: 3275-3281.

Eijsink, V. G., Axelsson, L., Diep, D. B., Håvarstein, L. S., Holo, H., and Nes, I. F. (2002) Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie Van Leeuwenhoek*.***81***: 639-654.

Engelke, G., Gutowski-Eckel, Z., Hammelmann, M., and Entian, K. D. (1992) Biosynthesis of the lantibiotic nisin: genomic organization and membrane localization of the NisB protein. *Appl Environ Microbiol*.***58***: 3730-3743.

Engelke, G., Gutowski-Eckel, Z., Kiesau, P., Siegers, K., Hammelmann, M., and Entian, K. D. (1994) Regulation of nisin biosynthesis and immunity in *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl Environ Microbiol*.***60***: 814-825.

Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., and Ishizaki, A. (2000) Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol Rev*.***24***: 85-106.

Ercolini, D., Ferrocino, I., La Storia, A., Mauriello, G., Gigli, S., Masi, P., and Villani, F. (2010) Development of spoilage microbiota in beef stored in nisin activated packaging. *Food Microbiol*.***27***: 137-143.

Euzeby, J. P. (1997) List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *Int J Syst Bacteriol*.***47***: 590-592.

F

Falagas, M. E., Betsi, G. I., and Athanasiou, S. (2006) Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review. *J Antimicrob Chemother*.***58***: 266-272.

FAO, T. W. H. O. (2001) Probiotic definition.

Farge, P. (1998) Données récentes sur l'étiopathogénie de la carie. *Archives de Pédiatrie*.***5***: 1140-1144.

Faye, T., Langsrud, T., Nes, I. F., and Holo, H. (2000) Biochemical and genetic characterization of propionicin T1, a new bacteriocin from *Propionibacterium thoenii*. *Appl Environ Microbiol*.***66***: 4230-4236.

Feldgarden, M., Young, S. K., Kodira, C. D., Zeng, Q., Koehrsen, M., Alvarado, L., Berlin, A., Borenstein, D., Chen, Z., Engels, R., Freedman, E., Gellesch, M., Goldberg, J., Griggs, A., Gujja, S., Heiman, D., Hepburn, T., Howarth, C., Jen, D., Larson, L., Lewis, B., Mehta, T., Park, D., Pearson, M., Roberts, A., Saif, S., Shea, T., Shenoy, N., Sisk, P., Stolte, C., Sykes, S., Walk, T., White, J., Yandava, C., Gilmore, M., Manson, J., Palmer, K., Carniol, K., Lander, E., Nusbaum, C., Galagan, J., and Birren, B. (2009) The Genome Sequence of *Enterococcus faecalis* strain AR01/DG. *The Broad Institute Genome Sequencing Platform*.***bases 1 to 1531***.

Felix, J. V., Papathanasopoulos, M. A., Smith, A. A., von Holy, A., and Hastings, J. W. (1994) Characterization of leucocin B-Ta11a: a bacteriocin from *Leuconostoc carnosum* Ta11a isolated from meat. *Curr Microbiol*.***29***: 207-212.

Feng, G., Guron, G. K., Churey, J. J., and Worobo, R. W. (2009) Characterization of mundticin L, a class IIa anti-*Listeria* bacteriocin from *Enterococcus mundtii* CUGF08. *Appl Environ Microbiol*.***75***: 5708-5713.

Ferchichi, M., Frere, J., Mabrouk, K., and Manai, M. (2001) Lactococcin MMFII, a novel class IIa bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* MMFII, isolated from a Tunisian dairy product. *FEMS Microbiol Lett*.***205***: 49-55.

Fernández de Palencia, P., de la Plaza, M., Mohedano, M. L., Martinez-Cuesta, M. C., Requena, T., Lopez, P., and Pelaez, C. (2004) Enhancement of 2-methylbutanal formation in cheese by using a fluorescently tagged Lacticin 3147 producing *Lactococcus lactis* strain. *Int J Food Microbiol*.***93***: 335-347.

Fernández, M., Sánchez-Hidalgo, M., García-Quintáns, N., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., López, P., and Maqueda, M. (2008) Processing of as-48ABC RNA in AS-48 enterocin production by *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol*.***190***: 240-250.

Fimland, G., Johnsen, L., Axelsson, L., Brurberg, M. B., Nes, I. F., Eijsink, V. G., and Nissen-Meyer, J. (2000) A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. *J Bacteriol*.***182***: 2643-2648.

Fimland, G., Sletten, K., and Nissen-Meyer, J. (2002a) The complete amino acid sequence of the pediocin-like antimicrobial peptide leucocin C. *Biochem Biophys Res Commun*.***295***: 826-827.

Fimland, G., Eijsink, V. G., and Nissen-Meyer, J. (2002b) Mutational analysis of the role of tryptophan residues in an antimicrobial peptide. *Biochemistry*.***41***: 9508-9515.

Fimland, G., Eijsink, V. G., and Nissen-Meyer, J. (2002c) Comparative studies of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins. *Microbiology*.***148***: 3661-3670.

Fimland, G., Johnsen, L., Dalhus, B., and Nissen-Meyer, J. (2005) Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. *J Pept Sci*.***11***: 688-696.

Fimland, G., Pirneskoski, J., Kaewsrichan, J., Jutila, A., Kristiansen, P. E., Kinnunen, P. K., and Nissen-Meyer, J. (2006) Mutational analysis and membrane-interactions of the

beta-sheet-like N-terminal domain of the pediocin-like antimicrobial peptide sakacin P. *Biochim Biophys Acta*.***1764***: 1132-1140.

Fimland, N., Rogne, P., Fimland, G., Nissen-Meyer, J., and Kristiansen, P. E. (2008) Three-dimensional structure of the two peptides that constitute the two-peptide bacteriocin plantaricin EF. *Biochim Biophys Acta*.***1784***: 1711-1719.

Fleury, Y., Dayem, M. A., Montagne, J. J., Chaboisseau, E., Le Caer, J. P., Nicolas, P., and Delfour, A. (1996) Covalent structure, synthesis, and structure-function studies of mesentericin Y 105(37), a defensive peptide from gram-positive bacteria *Leuconostoc mesenteroides*. *J Biol Chem*.***271***: 14421-14429.

Floriano, B., Ruiz-Barba, J. L., and Jiménez-Díaz, R. (1998) Purification and genetic characterization of enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. *Appl Environ Microbiol*.***64***: 4883-4890.

Flynn, S., van Sinderen, D., Thornton, G. M., Holo, H., Nes, I. F., and Collins, J. K. (2002) Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118. *Microbiology*.***148***: 973-984.

Folli, C., Ramazzina, I., Arcidiaco, P., Stoppini, M., and Berni, R. (2003) Purification of bacteriocin AS-48 from an *Enterococcus faecium* strain and analysis of the gene cluster involved in its production. *FEMS Microbiol Lett*.***221***: 143-149.

Franz, C. M., van Belkum, M. J., Holzapfel, W. H., Abriouel, H., and Gálvez, A. (2007) Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol Rev*.***31***: 293-310.

Fregeau Gallagher, N. L., Sailer, M., Niemczura, W. P., Nakashima, T. T., Stiles, M. E., and Vederas, J. C. (1997) Three-dimensional structure of leucocin A in trifluoroethanol and dodecylphosphocholine micelles: spatial location of residues critical for biological activity in type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biochemistry*.***36***: 15062-15072.

Fremaux, C., Héchard, Y., and Cenatiempo, Y. (1995) Mesentericin Y105 gene clusters in *Leuconostoc mesenteroides* Y105. *Microbiology*.***141 (Pt 7)***: 1637-1645.

Fujita, K., Ichimasa, S., Zendo, T., Koga, S., Yoneyama, F., Nakayama, J., and Sonomoto, K. (2007) Structural analysis and characterization of lacticin Q, a novel bacteriocin belonging to a new family of unmodified bacteriocins of gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol*.***73***: 2871-2877.

G

Gálvez, A., Gimenez-Gallego, G., Maqueda, M., and Valdivia, E. (1989) Purification and amino acid composition of peptide antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus* (*Enterococcus*) *faecalis* subsp. *liquefaciens* S-48. *Antimicrob Agents Chemother*.***33***: 437-441.

Gálvez, A., Abriouel, H., Lopez, R. L., and Ben Omar, N. (2007) Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int J Food Microbiol*.***120***: 51-70.

Gálvez, A., Lopez, R. L., Abriouel, H., Valdivia, E., and Omar, N. B. (2008) Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Crit Rev Biotechnol*.***28***: 125-152.

Gálvez, A., Abriouel, H., Ben Omar, N., and Lucas, R. (2011) Food Applications and Regulation

In: Drider, D., and Rebuffat, S. (Eds). *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer Verlag. Jaen, Spain. pp 253-390.

Galvin, M., Hill, C., and Ross, R. P. (1999) Lacticin 3147 displays activity in buffer against Gram positive bacterial pathogens which appear insensitive in standard plate assays *Lett. Appl. Microbiol.**28***: 355-358.

Gänzle, M. G., Hertel, C., and Hammes, W. P. (1999) Resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella* against nisin and curvacin A. *Int J Food Microbiol.**48***: 37-50.

Gao, F. H., Abee, T., and Konings, W. N. (1991) Mechanism of action of the peptide antibiotic nisin in liposomes and cytochrome c oxidase-containing proteoliposomes. *Appl Environ Microbiol.**57***: 2164-2170.

Garneau, S., Martin, N. I., and Vederas, J. C. (2002) Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie.**84***: 577-592.

Garriga, M., Aymerich, M. T., and Costa, S. (2002) Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage. *Food Microbiology.**19***: 509-518.

Ghrairi, T., Frére, J., Berjeaud, J. M., and Manai, M. (2005) Lactococcin MMT24, a novel two-peptide bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* isolated from rigouta cheese. *Int J Food Microbiol.**105***: 389-398.

Giffard, C. J., Dodd, H. M., Horn, N., Ladha, S., Mackie, A. R., Parr, A., Gasson, M. J., and Sanders, D. (1997) Structure-function relations of variant and fragment nisins studied with model membrane systems. *Biochemistry.**36***: 3802-3810.

Gilarová, R., Voldrich, M., Demnerová, K., Cerovský, M., and Dobiás, J. (1994) Cellular fatty acids analysis in the identification of lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol.**24***: 315-319.

Goldstein, B. P., Wei, J., Greenberg, K., and Novick, R. (1998) Activity of nisin against *Streptococcus pneumoniae, in vitro*, and in a mouse infection model. *J Antimicrob Chemother.**42***: 277-278.

González, C., Langdon, G. M., Bruix, M., Gálvez, A., Valdivia, E., Maqueda, M., and Rico, M. (2000) Bacteriocin AS-48, a microbial cyclic polypeptide structurally and functionally related to mammalian NK-lysin. *Proc Natl Acad Sci U S A.**97***: 11221-11226.

Gotcheva, V., Pandiella, S. S., Angelov, A., Roshkova, Z. G., and Webb, C. (2000) Microflora identification of the Bulgarian cereal-based fermented beverage boza. *Process Biochemistry.**36***: 127-130.

Gourbeyre, P., Denery, S., and Bodinier, M. (2011) Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. *J Leukoc Biol.**85***: 685-695.

Grangette, C., Muller-Alouf, H., Geoffroy, M., Goudercourt, D., Turneer, M., and Mercenier, A. (2002) Protection against tetanus toxin after intragastric administration of two recombinant lactic acid bacteria: impact of strain viability and in vivo persistence. *Vaccine.**20***: 3304-3309.

Guder, A., Schmitter, T., Wiedemann, I., Sahl, H. G., and Bierbaum, G. (2002) Role of the single regulator MrsR1 and the two-component system MrsR2/K2 in the regulation of mersacidin production and immunity. *Appl Environ Microbiol.**68***: 106-113.

Guinane, C. M., Cotter, P. D., Hill, C., and Ross, R. P. (2005) Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *J Appl Microbiol.**98***: 1316-1325.

H

Haldenwang, W. G. (1995) The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiol Rev.**59***: 1-30.

Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., and Stoodley, P. (2004) Bacterial biofilms : from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.**2***: 95-108.

Haller, D., Serrant, P., Granato, D., Schiffrin, E. J., and Blum, S. (2002) Activation of human NK cells by *staphylococci* and *lactobacilli* requires cell contact-dependent costimulation by autologous monocytes. *Clin Diagn Lab Immunol*.***9***: 649-657.

Hammes, W. P., and Hertel, C. (2006) The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. (Eds). *The prokaryotes, Vol. (4)*. Springer Science and Business Media. New York, USA. pp 320-403.

Hancioğlu, O., and Karapinar, M. (1997) Microflora of Boza, a traditional fermented Turkish beverage. *Int J Food Microbiol*.***35***: 271-274.

Hancock, R. E. (2000) Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications. *Expert Opin Investig Drugs*.***9***: 1723-1729.

Harbarth, S., Rutschmann, O., Sudre, P., and Pittet, D. (1998) Impact of methicillin resistance on the outcome of patients with bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*. *Arch Intern Med*.***158***: 182-189.

Hardie, J. M. (1986) Methods for the isolation and identification of anaerobes. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser*.***13***: 397-410.

Hastings, J. W., Sailer, M., Johnson, K., Roy, K. L., Vederas, J. C., and Stiles, M. E. (1991) Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *J Bacteriol*.***173***: 7491-7500.

Hauge, H. H., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., and Eijsink, V. G. (1998a) Amphiphilic alpha-helices are important structural motifs in the alpha and beta peptides that constitute the bacteriocin lactococcin G--enhancement of helix formation upon alpha-beta interaction. *Eur J Biochem*.***251***: 565-572.

Hauge, H. H., Mantzilas, D., Moll, G. N., Konings, W. N., Driessen, A. J., Eijsink, V. G., and Nissen-Meyer, J. (1998b) Plantaricin A is an amphiphilic alpha-helical bacteriocin-like pheromone which exerts antimicrobial and pheromone activities through different mechanisms. *Biochemistry*.***37***: 16026-16032.

Hauge, H. H., Mantzilas, D., Eijsink, V. G., and Nissen-Meyer, J. (1999) Membrane-mimicking entities induce structuring of the two-peptide bacteriocins plantaricin E/F and plantaricin J/K. *J Bacteriol*.***181***: 740-747.

Haugen, H. S., Fimland, G., Nissen-Meyer, J., and Kristiansen, P. E. (2005) Three-dimensional structure in lipid micelles of the pediocin-like antimicrobial peptide curvacin A. *Biochemistry*.***44***: 16149-16157.

Haugen, H. S., Fimland, G., and Nissen-Meyer, J. (2011) Mutational Analysis of Residues in the Helical Region of the Class IIa Bacteriocin Pediocin PA-1. *Appl Environ Microbiol*.***77***: 1966-1972.

Håvarstein, L. S., Holo, H., and Nes, I. F. (1994) The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Microbiology*.***140 (Pt 9)***: 2383-2389.

Håvarstein, L. S., Diep, D. B., and Nes, I. F. (1995) A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol Microbiol*.***16***: 229-240.

Héchard, Y., Derijard, B., Letellier, F., and Cenatiempo, Y. (1992) Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *J Gen Microbiol*.***138***: 2725-2731.

Héchard, Y., Berjeaud, J. M., and Cenatiempo, Y. (1999) Characterization of the mesB gene and expression of bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* Y105. *Curr Microbiol*.***39***: 265-269.

Héchard, Y., Pelletier, C., Cenatiempo, Y., and Frère, J. (2001) Analysis of sigma(54)-dependent genes in *Enterococcus faecalis*: a mannose PTS permease (EII(Man)) is involved in sensitivity to a bacteriocin, mesentericin Y105. *Microbiology*.***147***: 1575-1580.

Héchard, Y., and Sahl, H. G. (2002) Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie*.***84***: 545-557.

Helmann, J. D., and Chamberlin, M. J. (1988) Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu Rev Biochem*.***57***: 839-872.

Hemme, D., and Foucaud-Scheunemann, C. (2004) *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *Int Dairy J*.***14***: 467-494

Henderson, J. T., Chopko, A. L., and van Wassenaar, P. D. (1992) Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. *Arch Biochem Biophys*.***295***: 5-12.

Heng, N. C., Burtenshaw, G. A., Jack, R. W., and Tagg, J. R. (2007b) Ubericin A, a class IIa bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. *Appl Environ Microbiol*.***73***: 7763-7766.

Heng, N. C. K., Wescombe, P. A., Burton, J. P., Jack, R. W., and Tagg, J. R. (2007a) The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria. In: Riley, M. A., and Chavan, M. A. (Eds). *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. Springer Verlag. Berlin Germany. pp 45-92.

Herranz, C., Cintas, L. M., Hernández, P. E., Moll, G. N., and Driessen, A. J. (2001a) Enterocin P causes potassium ion efflux from *Enterococcus faecium* T136 cells. *Antimicrob Agents Chemother*.***45***: 901-904.

Herranz, C., Chen, Y., Chung, H. J., Cintas, L. M., Hernández, P. E., Montville, T. J., and Chikindas, M. L. (2001b) Enterocin P selectively dissipates the membrane potential of *Enterococcus faecium* T136. *Appl Environ Microbiol*.***67***: 1689-1692.

Heunis, T. D., and Dicks, L. M. (2010) Nanofibers offer alternative ways to the treatment of skin infections. *J Biomed Biotechnol*.***2010***.

Higgins, C. F. (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol*.***8***: 67-113.

Hinkle, D. C., and Chamberlin, M. J. (1972) Studies of the binding of *Escherichia coli* RNA polymerase to DNA. I. The role of sigma subunit in site selection. *J Mol Biol*.***70***: 157-185.

Holck, A., Axelsson, L., Birkeland, S. E., Aukrust, T., and Blom, H. (1992) Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J Gen Microbiol*.***138***: 2715-2720.

Holck, A. L., Axelsson, L., and Schillinger, U. (1994) Purification and cloning of piscicolin 61, a bacteriocin from *Carnobacterium piscicola* LV61. *Curr Microbiol*.***29***: 63-68.

Holo, H., Nilssen, O., and Nes, I. F. (1991) Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J Bacteriol*.***173***: 3879-3887.

Höltzel, A., . , Gänzle, M. G., Nicholson, G. J., Hammes, W. P., and Jung, G. (2000) The First Low Molecular Weight Antibiotic from Lactic Acid Bacteria: Reutericyclin, a New Tetramic Acid. *Angew Chem Int Ed Engl*.***39***: 2766-2768.

Holzapfel, W. H., Geisen, R., and Schillinger, U. (1995) Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int J Food Microbiol*.***24***: 343-362.

Holzapfel, W. H. (2002) Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *Int J Food Microbiol*.***75***: 197-212.

Howell, T. H., Fiorellini, J. P., Blackburn, P., Projan, S. J., de la Harpe, J., and Williams, R. C. (1993) The effect of a mouthrinse based on nisin, a bacteriocin, on developing plaque and gingivitis in beagle dogs. *J Clin Periodontol*.***20***: 335-339.

Hu, C. B., Zendo, T., Nakayama, J., and Sonomoto, K. (2008) Description of durancin TW-49M, a novel enterocin B-homologous bacteriocin in carrot-isolated *Enterococcus durans* QU 49. *J Appl Microbiol*.***105***: 681-690.

Hühne, K., Axelsson, L., Holck, A., and Kröckel, L. (1996) Analysis of the sakacin P gene cluster from *Lactobacillus sake* Lb674 and its expression in sakacin-negative *Lb. sake* strains. *Microbiology*.***142 (Pt 6)***: 1437-1448.

I

Immonen, T., Ye, S., Ra, R., Qiao, M., Paulin, L., and Saris, P. E. (1995) The codon usage of the *nisZ* operon in *Lactococcus lactis* N8 suggests a non-lactococcal origin of the conjugative nisin-sucrose transposon. *DNA Seq*.***5***: 203-218.

Ingham, A., Ford, M., Moore, R. J., and Tizard, M. (2003) The bacteriocin piscicolin 126 retains antilisterial activity *in vivo*. *J Antimicrob Chemother*.***51***: 1365-1371.

Ito, Y., Kawai, Y., Arakawa, K., Honme, Y., Sasaki, T., and Saito, T. (2009) Conjugative plasmid from *Lactobacillus gasseri* LA39 that carries genes for production of and immunity to the circular bacteriocin gassericin A. *Appl Environ Microbiol*.***75***: 6340-6351.

Iwatani, S., Zendo, T., Yoneyama, F., Nakayama, J., and Sonomoto, K. (2007) Characterization and structure analysis of a novel bacteriocin, lacticin Z, produced by *Lactococcus lactis* QU 14. *Biosci Biotechnol Biochem*.***71***: 1984-1992.

J

Jack, R. W., Tagg, J. R., and Ray, B. (1995) Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol Rev*.***59***: 171-200.

Jack, R. W., Wan, J., Gordon, J., Harmark, K., Davidson, B. E., Hillier, A. J., Wettenhall, R. E., Hickey, M. W., and Coventry, M. J. (1996) Characterization of the chemical and antimicrobial properties of piscicolin 126, a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* JG126. *Appl Environ Microbiol*.***62***: 2897-2903.

Jack, R. W., Bierbaum, G., and Sahl, H.-G. (1998) Lantibiotics and Related Peptides. In: Jack, R. W., Bierbaum, G., Sahl, H.-G. (Eds). *Lantibiotics and Related Peptides*. Springer Verlag. GeorgesTown, USA. pp

Jeavons, H. S. (2003) Prevention and treatment of vulvovaginal candidiasis using exogenous *Lactobacillus*. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*.***32***: 287-296.

Johansen, E., and Kibenich, A. (1992) Isolation and characterization of IS1165, an insertion sequence of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* and other lactic acid bacteria. *Plasmid*.***27***: 200-206.

Johnsen, L., Fimland, G., Mantzilas, D., and Nissen-Meyer, J. (2004) Structure-function analysis of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins: C-terminal parts of immunity proteins are involved in specific recognition of cognate bacteriocins. *Appl Environ Microbiol*.***70***: 2647-2652.

Johnsen, L., Dalhus, B., Leiros, I., and Nissen-Meyer, J. (2005a) 1.6-Angstroms crystal structure of EntA-im. A bacterial immunity protein conferring immunity to the antimicrobial activity of the pediocin-like bacteriocin enterocin A. *J Biol Chem*.***280***: 19045-19050.

Johnsen, L., Fimland, G., and Nissen-Meyer, J. (2005b) The C-terminal domain of pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition

of the C-terminal part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum. *J Biol Chem*.***280***: 9243-9250.

Joosten, H. M., Nunez, M., Devreese, B., Van Beeumen, J., and Marugg, J. D. (1996) Purification and characterization of enterocin 4, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* INIA 4. *Appl Environ Microbiol*.***62***: 4220-4223.

Jung, G. (1991) Lantibiotics, a survey. In: Jung, G., and Sahl, H.-G. (Eds). *Nisin and Novel Lantibiotics*. Escom. Leiden The Netherlands. pp 1-34.

K

Kabadjova, P., Gotcheva, I., Ivanova, I., and Dousset, X. (2000) Investigation of bacteriocin activity of lactic acid bacteria isolated from boza. *Biotechnol Biotechnol Equip*.***14***: 56-59.

Kabuki, T., Uenishi, H., Seto, Y., Yoshioka, T., and Nakajima, H. (2009) A unique lantibiotic, thermophilin 1277, containing a disulfide bridge and two thioether bridges. *J Appl Microbiol*.***106***: 853-862.

Kaila, M., Isolauri, E., Soppi, E., Virtanen, E., Laine, S., and Arvilommi, H. (1992) Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. *Pediatr Res*.***32***: 141-144.

Kaiser, A. L., and Montville, T. J. (1996) Purification of the bacteriocin bavaricin MN and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipid vesicles. *Appl Environ Microbiol*.***62***: 4529-4535.

Kaletta, C., and Entian, K. D. (1989) Nisin, a peptide antibiotic: cloning and sequencing of the *nisA* gene and posttranslational processing of its peptide product. *J Bacteriol*.***171***: 1597-1601.

Kalliomaki, M., Salminen, S., Arvilommi, H., Kero, P., Koskinen, P., and Isolauri, E. (2001) Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*.***357***: 1076-1079.

Kalmokoff, M. L., Banerjee, S. K., Cyr, T., Hefford, M. A., and Gleeson, T. (2001) Identification of a new plasmid-encoded sec-dependent bacteriocin produced by *Listeria innocua* 743. *Appl Environ Microbiol*.***67***: 4041-4047.

Kalmokoff, M. L., Cyr, T. D., Hefford, M. A., Whitford, M. F., and Teather, R. M. (2003) Butyrivibriocin AR10, a new cyclic bacteriocin produced by the ruminal anaerobe *Butyrivibrio fibrisolvens* AR10: characterization of the gene and peptide. *Can J Microbiol*.***49***: 763-773.

Kanatani, K., Oshimura, M., and Sano, K. (1995) Isolation and characterization of acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol*.***61***: 1061-1067.

Kandler, O. (1983) Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*.***49***: 209-224.

Kandler, O., and Weiss, N. (1986) Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212AL. In: Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., and Holt, J. G. (Eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology (8nd ed.)*. Baltimor. pp 208-1234.

Kankainen, M., Paulin, L., Tynkkynen, S., von Ossowski, I., Reunanen, J., Partanen, P., Satokari, R., Vesterlund, S., Hendrickx, A. P., Lebeer, S., De Keersmaecker, S. C., Vanderleyden, J., Hamalainen, T., Laukkanen, S., Salovuori, N., Ritari, J., Alatalo, E., Korpela, R., Mattila-Sandholm, T., Lassig, A., Hatakka, K., Kinnunen, K. T., Karjalainen, H., Saxelin, M., Laakso, K., Surakka, A., Palva, A., Salusjarvi, T., Auvinen, P., and de Vos, W. M. (2009) Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human- mucus binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*.***106***: 17193-17198.

Kawai, Y., Ishii, Y., Arakawa, K., Uemura, K., Saitoh, B., Nishimura, J., Kitazawa, H., Yamazaki, Y., Tateno, Y., Itoh, T., and Saito, T. (2004) Structural and functional differences in two cyclic bacteriocins with the same sequences produced by lactobacilli. *Appl Environ Microbiol*.***70***: 2906-2911.

Kawai, Y., Kusnadi, J., Kemperman, R., Kok, J., Ito, Y., Endo, M., Arakawa, K., Uchida, H., Nishimura, J., Kitazawa, H., and Saito, T. (2009) DNA sequencing and homologous expression of a small peptide conferring immunity to gassericin A, a circular bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* LA39. *Appl Environ Microbiol*.***75***: 1324-1330.

Kawamoto, S., Shima, J., Sato, R., Eguchi, T., Ohmomo, S., Shibato, J., Horikoshi, N., Takeshita, K., and Sameshima, T. (2002) Biochemical and genetic characterization of mundticin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7393. *Appl Environ Microbiol*.***68***: 3830-3840.

Kawulka, K., Sprules, T., McKay, R. T., Mercier, P., Diaper, C. M., Zuber, P., and Vederas, J. C. (2003) Structure of subtilosin A, an antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual posttranslational modifications linking cysteine sulfurs to alpha-carbons of phenylalanine and threonine. *J Am Chem Soc*.***125***: 4726-4727.

Kazazic, M., Nissen-Meyer, J., and Fimland, G. (2002) Mutational analysis of the role of charged residues in target-cell binding, potency and specificity of the pediocin-like bacteriocin sakacin P. *Microbiology*.***148***: 2019-2027.

Kelleher, S. L., Casas, I., Carbajal, N., and Lönnerdal, B. (2002) Supplementation of infant formula with the probiotic *Lactobacillus reuteri* and zinc: impact on enteric infection and nutrition in infant rhesus monkeys. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*.***35***: 162-168.

Kellner, R., Jung, G., Horner, T., Zahner, H., Schnell, N., Entian, K. D., and Gotz, F. (1988) Gallidermin: a new lanthionine-containing polypeptide antibiotic. *Eur J Biochem*.***177***: 53-59.

Kemperman, R., Kuipers, A., Karsens, H., Nauta, A., Kuipers, O., and Kok, J. (2003) Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Appl Environ Microbiol*.***69***: 1589-1597.

Kessler, H., Seip, S., Wein, T., Steuernagel, S., and Will, M. (1991) Structure of cinnamycin (Ro 09-0198) in solution In: Jung, G., and Sahl, H.-G. (Eds). *Nisin and Novel Lantibiotics*. Escom. Leiden, The Netherlands. pp 76-90.

Kim, I. K., Kim, M. K., Kim, J. H., Yim, H. S., Cha, S. S., and Kang, S. O. (2007) High resolution crystal structure of PedB: a structural basis for the classification of pediocin-like immunity proteins. *BMC Struct Biol*.***7***: 35.

Kim, J. F., Jeong, H., Lee, J. S., Choi, S. H., Ha, M., Hur, C. G., Kim, J. S., Lee, S., Park, H. S., Park, Y. H., and Oh, T. K. (2008) Complete genome sequence of *Leuconostoc citreum* KM20. *J Bacteriol*.***190***: 3093-3094.

Klaenhammer, T. R. (1988) Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*.***70***: 337-349.

Klaenhammer, T. R. (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev*.***12***: 39-85.

Klaenhammer, T. R., and Kullen, M. J. (1999) Selection and design of probiotics. *Int J Food Microbiol*.***50***: 45-57.

Kleerebezem, M., and Quadri, L. E. (2001) Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: a case of multicellular behavior. *Peptides*.***22***: 1579-1596.

Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O. P., Leer, R., Tarchini, R., Peters, S. A., Sandbrink, H. M., Fiers, M. W., Stiekema, W., Lankhorst, R. M., Bron, P. A., Hoffer, S. M., Groot, M. N., Kerkhoven, R., de Vries, M., Ursing,

B., de Vos, W. M., and Siezen, R. J. (2003) Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc Natl Acad Sci U S A.**100***: 1990-1995.

Klein, C., Kaletta, C., and Entian, K. D. (1993) Biosynthesis of the lantibiotic subtilin is regulated by a histidine kinase/response regulator system. *Appl Environ Microbiol.**59***: 296-303.

Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., and Reuter, G. (1998) Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol.**41***: 103-125

Knoetze, H., Todorov, S. D., and Dicks, L. M. (2008) A class IIa peptide from *Enterococcus mundtii* inhibits bacteria associated with otitis media. *Int J Antimicrob Agents.**31***: 228-234.

Koglin, A., and Walsh, C. T. (2009) Structural insights into nonribosomal peptide enzymatic assembly lines. *Nat Prod Rep.**26***: 987-1000.

Koponen, O., Tolonen, M., Qiao, M., Wahlstrom, G., Helin, J., and Saris, P. E. (2002) NisB is required for the dehydration and NisC for the lanthionine formation in the post-translational modification of nisin. *Microbiology.**148***: 3561-3568.

Kristiansen, P. E., Fimland, G., Mantzilas, D., and Nissen-Meyer, J. (2005) Structure and mode of action of the membrane-permeabilizing antimicrobial peptide pheromone plantaricin A. *J Biol Chem.**280***: 22945-22950.

Kruszewska, D., Sahl, H. G., Bierbaum, G., Pag, U., Hynes, S. O., and Ljungh, A. (2004) Mersacidin eradicates methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a mouse rhinitis model. *J Antimicrob Chemother.**54***: 648-653.

Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., Siezen, R. J., and De Vos, W. M. (1993) Characterization of the nisin gene cluster *nisABTCIPR* of *Lactococcus lactis*. Requirement of expression of the *nisA* and *nisI* genes for development of immunity. *Eur J Biochem.**216***: 281-291.

Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., de Ruyter, P. G., Luesink, E. J., and de Vos, W. M. (1995) Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J Biol Chem.**270***: 27299-27304.

L

Langdon, G. M., Bruix, M., Gálvez, A., Valdivia, E., Maqueda, M., and Rico, M. (1998) Sequence-specific 1H assignment and secondary structure of the bacteriocin AS-48 cyclic peptide. *J Biomol NMR.**12***: 173-175.

Larsen, A. G., Vogensen, F. K., and Josephsen, J. (1993) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. *J Appl Bacteriol.**75***: 113-122.

Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A., and Gobbetti, M. (2000) Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Appl Environ Microbiol.**66***: 4084-4090.

Le Marrec, C., Hyronimus, B., Bressollier, P., Verneuil, B., and Urdaci, M. C. (2000) Biochemical and genetic characterization of coagulin, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins, produced by *Bacillus coagulans* I(4). *Appl Environ Microbiol.**66***: 5213-5220.

Lee, J. H., Karamychev, V. N., Kozyavkin, S. A., Mills, D., Pavlov, A. R., Pavlova, N. V., Polouchine, N. N., Richardson, P. M., Shakhova, V. V., Slesarev, A. I., Weimer, B., and O'Sullivan, D. J. (2008) Comparative genomic analysis of the gut bacterium *Bifidobacterium longum* reveals loci susceptible to deletion during pure culture growth. *BMC Genomics.**9***: 247.

Lee, M. T., Chen, F. Y., and Huang, H. W. (2004) Energetics of pore formation induced by membrane active peptides. *Biochemistry*.***43***: 3590-3599.

Linnett, P. E., and Strominger, J. L. (1973) Additional antibiotic inhibitors of peptidoglycan synthesis. *Antimicrob Agents Chemother*.***4***: 231-236.

Logan, A. C., and Katzman, M. (2005) Major depressive disorder: probiotics may be an adjuvant therapy. *Med Hypotheses*.***64***: 533-538.

Lonetto, M., Gribskov, M., and Gross, C. A. (1992) The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J Bacteriol*.***174***: 3843-3849.

Lubelski, J., Rink, R., Khusainov, R., Moll, G. N., and Kuipers, O. P. (2008) Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin. *Cell Mol Life Sci*.***65***: 455-476.

Luchansky, J. B., and Call, J. E. (2004) Evaluation of nisin-coated cellulose casings for the control of *Listeria monocytogenes* inoculated onto the surface of commercially prepared frankfurters. *J Food Prot*.***67***: 1017-1021.

M

Maggi, L., Mastromarino, P., Macchia, S., Brigidi, P., Pirovano, F., Matteuzzi, D., and Conte, U. (2000) Technological and biological evaluation of tablets containing different strains of lactobacilli for vaginal administration. *Eur J Pharm Biopharm*.***50***: 389-395.

Majer, F., Schmid, D. G., Altena, K., Bierbaum, G., and Kupke, T. (2002) The flavoprotein MrsD catalyzes the oxidative decarboxylation reaction involved in formation of the peptidoglycan biosynthesis inhibitor mersacidin. *J Bacteriol*.***184***: 1234-1243.

Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D. M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J. H., Diaz-Muniz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B., and Mills, D. (2006) Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*.***103***: 15611-15616.

Mäkelä, P., Schillinger, U., Korkeala, H., and Holzapfel, W. H. (1992) Classification of ropy slime-producing lactic acid bacteria based on DNA-DNA homology, and identification of *Lactobacillus sake* and *Leuconostoc amelibiosum* as dominant spoilage organisms in meat products. *International Journal of Food Microbiology*.***16***: 167-172

Maldonado, A., Ruiz-Barba, J. L., and Jimenez-Diaz, R. (2003) Purification and genetic characterization of plantaricin NC8, a novel coculture-inducible two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8. *Appl Environ Microbiol*.***69***: 383-389.

Maldonado, A., Ruiz-Barba, J. L., and Jimenez-Diaz, R. (2004) Production of plantaricin NC8 by Lactobacillus plantarum NC8 is induced in the presence of different types of gram-positive bacteria. *Arch Microbiol*.***181***: 8-16.

Maldonado, A., Caballero-Guerrero, B., Jimenez, E., Jiménez-Díaz, R., Ruiz-Barba, J. L., and Rodriguez, J. M. (2009) Enterocin C, a class IIb bacteriocin produced by *E. faecalis* C901, a strain isolated from human colostrum. *Int J Food Microbiol*.***133***: 105-112.

Maqueda, M., Gálvez, A., Bueno, M. M., Sanchez-Barrena, M. J., González, C., Albert, A., Rico, M., and Valdivia, E. (2004) Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins. *Curr Protein Pept Sci*.***5***: 399-416.

Maqueda, M., Sanchez-Hidalgo, M., Fernandez, M., Montalban-Lopez, M., Valdivia, E., and Martinez-Bueno, M. (2008) Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev*.***32***: 2-22.

Marahiel, M. A., and Essen, L. O. (2009) Chapter 13. Nonribosomal peptide synthetases mechanistic and structural aspects of essential domains. *Methods Enzymol*.***458***: 337-351.

Marciset, O., Jeronimus-Stratingh, M. C., Mollet, B., and Poolman, B. (1997) Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin, that functions without a receptor. *J Biol Chem*.***272***: 14277-14284.

Märki, F., Hänni, E., Fredenhagen, A., and van Oostrum, J. (1991) Mode of action of the lanthionine-containing peptide antibiotics duramycin, duramycin B and C, and cinnamycin as indirect inhibitors of phospholipase A2. *Biochem Pharmacol*.***42***: 2027-2035.

Martin-Platero, A. M., Valdivia, E., Ruiz-Rodriguez, M., Soler, J. J., Martin-Vivaldi, M., Maqueda, M., and Martinez-Bueno, M. (2006) Characterization of antimicrobial substances produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, isolated from the uropygial gland of the hoopoe (Upupa epops). *Appl Environ Microbiol*.***72***: 4245-4249.

Martin-Visscher, L. A., Sprules, T., Gursky, L. J., and Vederas, J. C. (2008a) Nuclear magnetic resonance solution structure of PisI, a group B immunity protein that provides protection against the type IIa bacteriocin piscicolin 126, PisA. *Biochemistry*.***47***: 6427-6436.

Martin-Visscher, L. A., van Belkum, M. J., Garneau-Tsodikova, S., Whittal, R. M., Zheng, J., McMullen, L. M., and Vederas, J. C. (2008b) Isolation and characterization of carnocyclin a, a novel circular bacteriocin produced by Carnobacterium maltaromaticum UAL307. *Appl Environ Microbiol*.***74***: 4756-4763.

Martin-Visscher, L. A., Gong, X., Duszyk, M., and Vederas, J. C. (2009) The three-dimensional structure of carnocyclin A reveals that many circular bacteriocins share a common structural motif. *J Biol Chem*.***284***: 28674-28681.

Martin-Visscher, L. A., Yoganathan, S., Sit, C. S., Lohans, C. T., and Vederas, J. C. (2011) The activity of bacteriocins from *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307 against Gram-negative bacteria in combination with EDTA treatment. *FEMS Microbiol Lett*.***317***: 152-159.

Martin, N. I., Sprules, T., Carpenter, M. R., Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R. P., and Vederas, J. C. (2004) Structural characterization of lacticin 3147, a two-peptide lantibiotic with synergistic activity. *Biochemistry*.***43***: 3049-3056.

Martinez-Bueno, M., Maqueda, M., Galvez, A., Samyn, B., Van Beeumen, J., Coyette, J., and Valdivia, E. (1994) Determination of the gene sequence and the molecular structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *J Bacteriol*.***176***: 6334-6339.

Martinez-Bueno, M., Valdivia, E., Gálvez, A., Coyette, J., and Maqueda, M. (1998) Analysis of the gene cluster involved in production and immunity of the peptide antibiotic AS-48 in *Enterococcus faecalis*. *Mol Microbiol*.***27***: 347-358.

Martínez, B., Fernandez, M., Suarez, J. E., and Rodríguez, A. (1999) Synthesis of lactococcin 972, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* IPLA 972, depends on the expression of a plasmid-encoded bicistronic operon. *Microbiology*.***145 (Pt 11)***: 3155-3161.

Martínez, B., Rodríguez, A., and Suarez, J. E. (2000) Lactococcin 972, a bacteriocin that inhibits septum formation in lactococci. *Microbiology*.***146 (Pt 4)***: 949-955.

Martínez, B., Zomer, A. L., Rodríguez, A., Kok, J., and Kuipers, O. P. (2007) Cell envelope stress induced by the bacteriocin Lcn972 is sensed by the Lactococcal two-component system CesSR. *Mol Microbiol*.***64***: 473-486.

Martínez, B., Böttiger, T., Schneider, T., Rodríguez, A., Sahl, H. G., and Wiedemann, I. (2008) Specific interaction of the unmodified bacteriocin Lactococcin 972 with the cell wall precursor lipid II. *Appl Environ Microbiol*.***74***: 4666-4670.

Martinez Viedma, P., Sobrino Lopez, A., Ben Omar, N., Abriouel, H., Lucas Lopez, R., Valdivia, E., Martin Belloso, O., and Galvez, A. (2008) Enhanced bactericidal effect of enterocin AS-48 in combination with high-intensity pulsed-electric field treatment against *Salmonella enterica* in apple juice. *Int J Food Microbiol*.***128***: 244-249.

Marugg, J. D., Gonzalez, C. F., Kunka, B. S., Ledeboer, A. M., Pucci, M. J., Toonen, M. Y., Walker, S. A., Zoetmulder, L. C., and Vandenbergh, P. A. (1992) Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, and bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. *Appl Environ Microbiol*.***58***: 2360-2367.

Mascher, T., Zimmer, S. L., Smith, T. A., and Helmann, J. D. (2004) Antibiotic-inducible promoter regulated by the cell envelope stress-sensing two-component system LiaRS of *Bacillus subtilis*. *Antimicrob Agents Chemother*.***48***: 2888-2896.

Mathieu, F., Suwandhi, I. S., Rekhif, N., Milliere, J. B., and Lefebvre, G. (1993) Mesenterocin 52, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* FR 52. *J Appl Bacteriol*.***74***: 372-379.

McAuliffe, O., Hill, C., and Ross, R. P. (2000) Each peptide of the two-component lantibiotic lacticin 3147 requires a separate modification enzyme for activity. *Microbiology*.***146 (Pt 9)***: 2147-2154.

McAuliffe, O., O'Keeffe, T., Hill, C., and Ross, R. P. (2001) Regulation of immunity to the two-component lantibiotic, lacticin 3147, by the transcriptional repressor LtnR. *Mol Microbiol*.***39***: 982-993.

McCormick, J. K., Poon, A., Sailer, M., Gao, Y., Roy, K. L., McMullen, L. M., Vederas, J. C., Stiles, M. E., and Van Belkum, M. J. (1998) Genetic characterization and heterologous expression of brochocin-C, an antibotulinal, two-peptide bacteriocin produced by *Brochothrix campestris* ATCC 43754. *Appl Environ Microbiol*.***64***: 4757-4766.

McLeod, A., Nyquist, O. L., Snipen, L., Naterstad, K., and Axelsson, L. (2008) Diversity of *Lactobacillus sakei* strains investigated by phenotypic and genotypic methods. *Syst Appl Microbiol*.***31***: 393-403.

Merrick, M. J. (1993) In a class of its own--the RNA polymerase sigma factor sigma 54 (sigma N). *Mol Microbiol*.***10***: 903-909.

Métivier, A., Pilet, M. F., Dousset, X., Sorokine, O., Anglade, P., Zagorec, M., Piard, J. C., Marion, D., Cenatiempo, Y., and Fremaux, C. (1998) Divercin V41, a new bacteriocin with two disulphide bonds produced by *Carnobacterium divergens* V41: primary structure and genomic organization. *Microbiology*.***144 (Pt 10)***: 2837-2844.

Miller, K. W., Schamber, R., Chen, Y., and Ray, B. (1998a) Production of active chimeric pediocin AcH in *Escherichia coli* in the absence of processing and secretion genes from the *Pediococcus pap* operon. *Appl Environ Microbiol*.***64***: 14-20.

Miller, K. W., Schamber, R., Osmanagaoglu, O., and Ray, B. (1998b) Isolation and characterization of pediocin AcH chimeric protein mutants with altered bactericidal activity. *Appl Environ Microbiol*.***64***: 1997-2005.

Moll, G., Ubbink-Kok, T., Hildeng-Hauge, H., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., Konings, W. N., and Driessen, A. J. (1996) Lactococcin G is a potassium ion-conducting, two-component bacteriocin. *J Bacteriol*.***178***: 600-605.

Moll, G., Hildeng-Hauge, H., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., Konings, W. N., and Driessen, A. J. (1998) Mechanistic properties of the two-component bacteriocin lactococcin G. *J Bacteriol*.***180***: 96-99.

Moll, G. N., van den Akker, E., Hauge, H. H., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., Konings, W. N., and Driessen, A. J. (1999) Complementary and overlapping selectivity of the two-peptide bacteriocins plantaricin EF and JK. *J Bacteriol*.***181***: 4848-4852.

Morency, H., Mota-Meira, M., LaPointe, G., Lacroix, C., and Lavoie, M. C. (2001) Comparison of the activity spectra against pathogens of bacterial strains producing a mutacin or a lantibiotic. *Can J Microbiol*.***47***: 322-331.

Morgan, S. M., Galvin, M., Ross, R. P., and Hill, C. (2001) Evaluation of a spray-dried lacticin 3147 powder for the control of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in a range of food systems. *Lett Appl Microbiol*.***33***: 387-391.

Morgan, S. M., O'connor, P. M., Cotter, P. D., Ross, R. P., and Hill, C. (2005) Sequential actions of the two component peptides of the lantibiotic lacticin 3147 explain its antimicrobial activity at nanomolar concentrations. *Antimicrob Agents Chemother*.***49***: 2606-2611.

Morita, H., Toh, H., Fukuda, S., Horikawa, H., Oshima, K., Suzuki, T., Murakami, M., Hisamatsu, S., Kato, Y., Takizawa, T., Fukuoka, H., Yoshimura, T., Itoh, K., O'Sullivan, D. J., McKay, L. L., Ohno, H., Kikuchi, J., Masaoka, T., and Hattori, M. (2008) Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal a genomic island for reuterin and cobalamin production. *DNA Res*.***15***: 151-161.

Mota-Meira, M., LaPointe, G., Lacroix, C., and Lavoie, M. C. (2000) MICs of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens. *Antimicrob Agents Chemother*.***44***: 24-29.

N

Nagao, J., Asaduzzaman, S. M., Aso, Y., Okuda, K., Nakayama, J., and Sonomoto, K. (2006) Lantibiotics: insight and foresight for new paradigm. *J Biosci Bioeng*.***102***: 139-149.

Nair, L. S., and Laurencin, C. T. (2007) Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog Polymer Sci*.***32***: 762-798.

Navaratna, M. A., Sahl, H. G., and Tagg, J. R. (1999) Identification of genes encoding two-component lantibiotic production in *Staphylococcus aureus* C55 and other phage group II *S. aureus* strains and demonstration of an association with the exfoliative toxin B gene. *Infect Immun*.***67***: 4268-4271.

Neetoo, H., Ye, M., Chen, H., Joerger, R. D., Hicks, D. T., and Hoover, D. G. (2008) Use of nisin-coated plastic films to control *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged cold-smoked salmon. *Int J Food Microbiol*.***122***: 8-15.

Nes, I. F., Diep, D. B., Havarstein, L. S., Brurberg, M. B., Eijsink, V., and Holo, H. (1996) Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*.***70***: 113-128.

Nes, I. F., and Eijsink, V. G. H. (1999) Regulation of Group II peptide bacteriocin synthesis by quorum sensing mechanisms. In: Danny, G. M., and Winan, S. C. (Eds). *Cell-Cell Signaling in Bacteria*. American Society of Microbiology. Washington, DC. pp 175-192.

Nes, I. F., Diep, D. B., and Holo, H. (2007) Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J Bacteriol*.***189***: 1189-1198.

Netz, D. J., Sahl, H. G., Marcelino, R., dos Santos Nascimento, J., de Oliveira, S. S., Soares, M. B., and do Carmo de Freire Bastos, M. (2001) Molecular characterisation of aureocin A70, a multi-peptide bacteriocin isolated from *Staphylococcus aureus*. *J Mol Biol*.***311***: 939-949.

Netz, D. J., Pohl, R., Beck-Sickinger, A. G., Selmer, T., Pierik, A. J., Bastos Mdo, C., and Sahl, H. G. (2002) Biochemical characterisation and genetic analysis of aureocin A53, a new, atypical bacteriocin from *Staphylococcus aureus*. *J Mol Biol*.***319***: 745-756.

Nissen-Meyer, J., Holo, H., Håvarstein, L. S., Sletten, K., and Nes, I. F. (1992) A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J Bacteriol*.***174***: 5686-5692.

Nissen-Meyer, J., Håvarstein, L. S., Holo, H., Sletten, K., and Nes, I. F. (1993a) Association of the lactococcin A immunity factor with the cell membrane: purification and characterization of the immunity factor. *J Gen Microbiol*.***139***: 1503-1509.

Nissen-Meyer, J., Larsen, A. G., Sletten, K., Daeschel, M., and Nes, I. F. (1993b) Purification and characterization of plantaricin A, a *Lactobacillus plantarum* bacteriocin whose activity depends on the action of two peptides. *J Gen Microbiol*.***139***: 1973-1978.

Nissen-Meyer, J., and Nes, I. F. (1997) Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Arch Microbiol*.***167***: 67-77.

Nissen-Meyer, J., Rogne, P., Oppegård, C., Haugen, H. S., and Kristiansen, P. E. (2009) Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Curr Pharm Biotechnol*.***10***: 19-37.

Nissen-Meyer, J., Oppegard, C., Rogne, P., Haugen, H. S., and Kristiansen, P. E. (2010) Structure and Mode-of-Action of the Two-Peptide (Class-IIb) Bacteriocins. *Probiotics Antimicrob Proteins*.***2***: 52-60.

Niu, W. W., and Neu, H. C. (1991) Activity of mersacidin, a novel peptide, compared with that of vancomycin, teicoplanin, and daptomycin. *Antimicrob Agents Chemother*.***35***: 998-1000.

Nomoto, K. (2005) Prevention of infections by probiotics. *J Biosci Bioeng*.***100***: 583-592.

O

O'Mahony, T., Rekhif, N., Cavadini, C., and Fitzgerald, G. F. (2001) The application of a fermented food ingredient containing variacin, a novel antimicrobial produced by *Kocuria varians*, to control the growth of *Bacillus cereus* in chilled dairy products. *J Appl Microbiol*.***90***: 106-114.

O'Sullivan, L., Ross, R. P., and Hill, C. (2002) Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*.***84***: 593-604.

O'Sullivan, L., O'Connor E, B., Ross, R. P., and Hill, C. (2006) Evaluation of live-culture-producing lacticin 3147 as a treatment for the control of *Listeria monocytogenes* on the surface of smear-ripened cheese. *J Appl Microbiol*.***100***: 135-143.

Ogier, J. C., Casalta, E., Farrokh, C., and Saihi, A. (2008) Safety assessment of dairy microorganisms: the *Leuconostoc* genus. *Int J Food Microbiol*.***126***: 286-290.

Okeley, N. M., Paul, M., Stasser, J. P., Blackburn, N., and van der Donk, W. A. (2003) SpaC and NisC, the cyclases involved in subtilin and nisin biosynthesis, are zinc proteins. *Biochemistry*.***42***: 13613-13624.

Oppegård, C., Fimland, G., Thorbaek, L., and Nissen-Meyer, J. (2007a) Analysis of the two-peptide bacteriocins lactococcin G and enterocin 1071 by site-directed mutagenesis. *Appl Environ Microbiol*.***73***: 2931-2938.

Oppegård, C., Rogne, P., Emanuelsen, L., Kristiansen, P. E., Fimland, G., and Nissen-Meyer, J. (2007b) The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. *J Mol Microbiol Biotechnol*.***13***: 210-219.

Oppegård, C., Schmidt, J., Kristiansen, P. E., and Nissen-Meyer, J. (2008) Mutational analysis of putative helix-helix interacting GxxxG-motifs and tryptophan residues in the two-peptide bacteriocin lactococcin G. *Biochemistry*.***47***: 5242-5249.

Oppegård, C., Emanuelsen, L., Thorbek, L., Fimland, G., and Nissen-Meyer, J. (2010a) The lactococcin G immunity protein recognizes specific regions in both peptides constituting the two-peptide bacteriocin lactococcin G. *Appl Environ Microbiol*.***76***: 1267-1273.

Oppegård, C., Rogne, P., Kristiansen, P. E., and Nissen-Meyer, J. (2010b) Structure analysis of the two-peptide bacteriocin lactococcin G by introducing D-amino acid residues. *Microbiology*.***156***: 1883-1889.

P

Paik, S. H., Chakicherla, A., and Hansen, J. N. (1998) Identification and characterization of the structural and transporter genes for, and the chemical and biological properties of, sublancin 168, a novel lantibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *J Biol Chem*.***273***: 23134-23142.

Papagianni, M., and Anastasiadou, S. (2009) Pediocins: The bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications. *Microb Cell Fact*.***8***: 3.

Papathanasopoulos, M. A., Dykes, G. A., Revol-Junelles, A. M., Delfour, A., von Holy, A., and Hastings, J. W. (1998) Sequence and structural relationships of leucocins A-, B- and C-TA33a from *Leuconostoc mesenteroides* TA33a. *Microbiology*.***144 (Pt 5)***: 1343-1348.

Parente, E., Brienza, C., Ricciardi, A., and Addario, G. (1997) Growth and bacteriocin production by *Enterococcus faecium* DPC1146 in batch and continuous culture. *J Ind Microbiol Biotechnol*.***18***: 62-67.

Penner, R., Fedorak, R. N., and Madsen, K. L. (2005a) Probiotics and nutraceuticals: non-medicinal treatments of gastrointestinal diseases. *Curr Opin Pharmacol*.***5***: 596-603.

Penner, R. M., and Fedorak, R. N. (2005b) Probiotics in the management of inflammatory bowel disease. *MedGenMed*.***7***: 19.

Peschel, A., Augustin, J., Kupke, T., Stevanovic, S., and Götz, F. (1993) Regulation of epidermin biosynthetic genes by EpiQ. *Mol Microbiol*.***9***: 31-39.

Picard, C., Fioramonti, J., Francois, A., Robinson, T., Neant, F., and Matuchansky, C. (2005) Review article: bifidobacteria as probiotic agents -- physiological effects and clinical benefits. *Aliment Pharmacol Ther*.***22***: 495-512.

Pirotta, M., Gunn, J., Chondros, P., Grover, S., O'Malley, P., Hurley, S., and Garland, S. (2004) Effect of *Lactobacillus* in preventing post-antibiotic vulvovaginal candidiasis: a randomised controlled trial. *BMJ*.***329***: 548.

Plummer, S., Weaver, M. A., Harris, J. C., Dee, P., and Hunter, J. (2004) *Clostridium difficile* pilot study: effects of probiotic supplementation on the incidence of *C. difficile* diarrhoea. *Int Microbiol*.***7***: 59-62.

Pot, B. (2008) The taxonomy of lactic acid bacteria. In: Corrieu, G., and Luquet, F. M. (Eds). *Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments*. Lavoisier. Paris, France pp 1-152.

Prescott, L., Harley, J., and Klein, D. (2003) Le métabolisme: la libération et la conservation de l'énergie. In: Boeck, d., and Larcier (Eds). *Microbiologie*. Bruxelles, Belgium. pp 172-203.

Pridmore, R. D., Berger, B., Desiere, F., Vilanova, D., Barretto, C., Pittet, A. C., Zwahlen, M. C., Rouvet, M., Altermann, E., Barrangou, R., Mollet, B., Mercenier, A., Klaenhammer, T., Arigoni, F., and Schell, M. A. (2004) The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *Proc Natl Acad Sci U S A*.***101***: 2512-2517.

Q

Qi, F., Chen, P., and Caufield, P. W. (2001) The group I strain of *Streptococcus mutans*, UA140, produces both the lantibiotic mutacin I and a nonlantibiotic bacteriocin, mutacin IV. *Appl Environ Microbiol*.***67***: 15-21.

Qin, X., Bachman, B., Battles, P., Bell, A., Bess, C., Bickham, C., Chaboub, L., Chen, D., Coyle, M., Deiros, D. R., Dinh, H., Forbes, L., Fowler, G., Francisco, L., Fu, Q., Gubbala, S., Hale, W., Han, Y., Hemphill, L., Highlander, S. K., Hirani, K., Hogues, M., Jackson, L., Jakkamsetti, A., Javaid, M., Jiang, H., Korchina, V., Kovar, C., Lara, F., Lee, S., Mata, R., Mathew, T., Moen, C., Morales, K., Munidasa, M., Nazareth, L., Ngo, R., Nguyen, L., Okwuonu, G., Ongeri, F., Patil, S., Petrosino, J., Pham, C., Pham, P., Pu, L.-L., Puazo, M., Raj, R., Reid, J., Rouhana, J., Saada, N., Shang, Y., Simmons, D., Thornton, R., Warren, J., Weissenberger, G., Zhang, J., Zhang, L., Zhou, C., Zhu, D., Muzny, D., Worley, K., and Gibbs, R. (2009) *Weissella paramesenteroides* ATCC 33313 complete genome sequence. *Human Genome Sequencing Center, Baylor College of Medicine, One Baylor Plaza, Houston, TX 77030, USA*.

Quadri, L. E., Sailer, M., Roy, K. L., Vederas, J. C., and Stiles, M. E. (1994) Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. *J Biol Chem*.***269***: 12204-12211.

Quadri, L. E., Kleerebezem, M., Kuipers, O. P., de Vos, W. M., Roy, K. L., Vederas, J. C., and Stiles, M. E. (1997b) Characterization of a locus from *Carnobacterium piscicola* LV17B involved in bacteriocin production and immunity: evidence for global inducer-mediated transcriptional regulation. *J Bacteriol*.***179***: 6163-6171.

Quiberoni, A., Rezaiki, L., El Karoui, M., Biswas, I., Tailliez, P., and Gruss, A. (2001) Distinctive features of homologous recombination in an 'old' microorganism, *Lactococcus lactis*. *Res Microbiol*.***152***: 131-139.

R

Ramnath, M., Beukes, M., Tamura, K., and Hastings, J. W. (2000) Absence of a putative mannose-specific phosphotransferase system enzyme IIAB component in a leucocin A-resistant strain of *Listeria monocytogenes*, as shown by two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*.***66***: 3098-3101.

Reid, G., and Bruce, A. W. (2001) Selection of lactobacillus strains for urogenital probiotic applications. *J Infect Dis*.***183 Suppl 1***: S77-80.

Reid, G., and Bruce, A. W. (2003a) Urogenital infections in women: can probiotics help? *Postgrad Med J*.***79***: 428-432.

Reid, G., Jass, J., Sebulsky, M. T., and McCormick, J. K. (2003b) Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev*.***16***: 658-672.

Revol-Junelles, A. M., Mathis, R., Krier, F., Fleury, Y., Delfour, A., and Lefebvre, G. (1996) *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 synthesizes two distinct bacteriocins. *Lett Appl Microbiol*.***23***: 120-124.

Richard, C., Drider, D., Elmorjani, K., Marion, D., and Prevost, H. (2004) Heterologous expression and purification of active divercin V41, a class IIa bacteriocin encoded by a synthetic gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*.***186***: 4276-4284.

Riffon, R., Sayasith, K., Khalil, H., Dubreuil, P., Drolet, M., and Lagace, J. (2001) Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *J Clin Microbiol*.***39***: 2584-2589.

Rihakova, J., Cappelier, J. M., Hue, I., Demnerova, K., Federighi, M., Prevost, H., and Drider, D. (2010) In vivo activities of recombinant divercin V41 and its structural variants against *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob Agents Chemother*.***54***: 563-564.

Robertson, A., Tirado, C., Lobstein, T., Jermini, M., Knai, C., Jensen, J. H., Ferro-Luzzi, A., and James, W. P. (2004) Food and health in Europe: a new basis for action. *WHO Reg Publ Eur Ser*: i-xvi, 1-385, back cover.

Robichon, D., Gouin, E., Debarbouille, M., Cossart, P., Cenatiempo, Y., and Héchard, Y. (1997) The *rpoN* (sigma54) gene from *Listeria monocytogenes* is involved in resistance to mesentericin Y105, an antibacterial peptide from *Leuconostoc mesenteroides*. *J Bacteriol*.***179***: 7591-7594.

Rodrigues, U. M., Aguirre, M., Facklam, R. R., and Collins, M. D. (1991) Specific and intraspecific molecular typing of lactococci based on polymorphism of DNA encoding rRNA. *J Appl Bacteriol*.***71***: 509-516.

Rodríguez, J. M., Martínez, M., and IKok, J. (2002) Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Crit Rev Food Sci Nutr*.***42***: 91-121.

Rogers, L. A. (1928) The Inhibiting Effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *J Bacteriol*.***16***: 321-325.

Rogne, P., Fimland, G., Nissen-Meyer, J., and Kristiansen, P. E. (2008) Three-dimensional structure of the two peptides that constitute the two-peptide bacteriocin lactococcin G. *Biochim Biophys Acta*.***1784***: 543-554.

Rogne, P., Haugen, C., Fimland, G., Nissen-Meyer, J., and Kristiansen, P. E. (2009) Three-dimensional structure of the two-peptide bacteriocin plantaricin JK. *Peptides*.***30***: 1613-1621.

Roland, P. S., and Stroman, D. W. (2002) Microbiology of acute otitis externa. *Laryngoscope*.***112***: 1166-1177.

Ross, R. P., Galvin, M., McAuliffe, O., Morgan, S. M., Ryan, M. P., Twomey, D. P., Meaney, W. J., and Hill, C. (1999) Developing applications for lactococcal bacteriocins. *Antonie Van Leeuwenhoek*.***76***: 337-346.

Ross, R. P., Morgan, S., and Hill, C. (2002) Preservation and fermentation: past, present and future. *Int J Food Microbiol*.***79***: 3-16.

Ruhr, E., and Sahl, H. G. (1985) Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles. *Antimicrob Agents Chemother*.***27***: 841-845.

Ruiz-Barba, J. L., Floriano, B., Maldonado-Barragan, A., and Jiménez-Díaz, R. (2007) Molecular analysis of the 21-kb bacteriocin-encoding plasmid pEF1 from Enterococcus faecium 6T1a. *Plasmid*.***57***: 175-181.

Ruiz, F. O., Gerbaldo, G., Asurmendi, P., Pascual, L. M., Giordano, W., and Barberis, I. L. (2009) Antimicrobial activity, inhibition of urogenital pathogens, and synergistic interactions between *Lactobacillus* strains. *Curr Microbiol*.***59***: 497-501.

S

Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., and Mattila-Sandholm, T. (2000) Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnol*.***84***: 197-215.

Şahingil, D., Işleroğlu, H., Yildirim, Z., Akçelik, M., and Yildirim, M. (2009) Characterization of lactococcin BZ produced by Lactococcus lactis subsp. lactis BZ isolated from boza. *Tubitak*.

Sahl, H. G., Jack, R. W., and Bierbaum, G. (1995) Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *Eur J Biochem*.***230***: 827-853.

Sahl, H. G., and Bierbaum, G. (1998) Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol*.***52***: 41-79.

Salmaso, S., Elvassore, N., Bertucco, A., Lante, A., and Caliceti, P. (2004) Nisin-loaded poly-L-lactide nano-particles produced by CO2 anti-solvent precipitation for sustained antimicrobial activity. *Int J Pharm*.***287***: 163-173.

Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W. M., Fondén, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S. E., and Mattila-Sandholm, T. (1998) Demonstration of safety of probiotics -- a review. *Int J Food Microbiol*.***44***: 93-106.

Sánchez-Barrena, M. J., Martínez-Ripoll, M., Gálvez, A., Valdivia, E., Maqueda, M., Cruz, V., and Albert, A. (2003) Structure of bacteriocin AS-48: from soluble state to membrane bound state. *J Mol Biol*.***334***: 541-549.

Sánchez, J., Diep, D. B., Herranz, C., Nes, I. F., Cintas, L. M., and Hernández, P. E. (2007) Amino acid and nucleotide sequence, adjacent genes, and heterologous expression of hiracin JM79, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, isolated from Mallard ducks (Anas platyrhynchos). *FEMS Microbiol Lett*.***270***: 227-236.

Sánchez, J., Borrero, J., Gomez-Sala, B., Basanta, A., Herranz, C., Cintas, L. M., and Hernandez, P. E. (2008) Cloning and heterologous production of Hiracin JM79, a Sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, in lactic acid bacteria and Pichia pastoris. *Appl Environ Microbiol*.***74***: 2471-2479.

Sass, P., Jansen, A., Szekat, C., Sass, V., Sahl, H. G., and Bierbaum, G. (2008) The lantibiotic mersacidin is a strong inducer of the cell wall stress response of *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol*.***8***: 186.

Savilahti, E., Kuitunen, M., and Vaarala, O. (2008) Pre and probiotics in the prevention and treatment of food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*.***8***: 243-248.

Sawa, N., Zendo, T., Kiyofuji, J., Fujita, K., Himeno, K., Nakayama, J., and Sonomoto, K. (2009) Identification and characterization of lactocyclicin Q, a novel cyclic bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. strain QU 12. *Appl Environ Microbiol*.***75***: 1552-1558.

Sawa, N., Okamura, K., Zendo, T., Himeno, K., Nakayama, J., and Sonomoto, K. (2010) Identification and characterization of novel multiple bacteriocins produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* QU 15. *J Appl Microbiol*.***109***: 282-291.

Schagger, H., and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*.***166***: 368-379.

Schiffrin, E. J., Brassart, D., Servin, A. L., Rochat, F., and Donnet-Hughes, A. (1997) Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *Am J Clin Nutr*.***66***: 515S-520S.

Schmid, D. G., Majer, F., Kupke, T., and Jung, G. (2002) Electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry to reveal the substrate specificity of the peptidyl-cysteine decarboxylase EpiD. *Rapid Commun Mass Spectrom*.***16***: 1779-1784.

Schmitz, S., Hoffmann, A., Szekat, C., Rudd, B., and Bierbaum, G. (2006) The lantibiotic mersacidin is an autoinducing peptide. *Appl Environ Microbiol*.***72***: 7270-7277.

Schöbitz, R., Suazo, V., Costa, M., and Ciampi, L. (2003) Effects of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Carnobacterium piscicola* against human and salmon isolates of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol*.***84***: 237-244.

Segal, N., Givon-Lavi, N., Leibovitz, E., Yagupsky, P., Leiberman, A., and Dagan, R. (2005) Acute otitis media caused by *Streptococcus pyogenes* in children. *Clin Infect Dis*.***41***: 35-41.

Senes, A., Gerstein, M., and Engelman, D. M. (2000) Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in

association with beta-branched residues at neighboring positions. *J Mol Biol*.***296***: 921-936.

Senes, A., Engel, D. E., and DeGrado, W. F. (2004) Folding of helical membrane proteins: the role of polar, GxxxG-like and proline motifs. *Curr Opin Struct Biol*.***14***: 465-479.

Settanni, L., and Corsetti, A. (2008) Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *Int J Food Microbiol*.***121***: 123-138.

Shelburne, C. E., An, F. Y., Dholpe, V., Ramamoorthy, A., Lopatin, D. E., and Lantz, M. S. (2007) The spectrum of antimicrobial activity of the bacteriocin subtilosin A. *J Antimicrob Chemother*.***59***: 297-300.

Siegers, K., and Entian, K. D. (1995) Genes involved in immunity to the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl Environ Microbiol*.***61***: 1082-1089.

Simon, L., Fremaux, C., Cenatiempo, Y., and Berjeaud, J. M. (2002) Sakacin g, a new type of antilisterial bacteriocin. *Appl Environ Microbiol*.***68***: 6416-6420.

Sobel, J. D. (1999) Limitations of antifungal agents in the treatment of *Candida vaginitis*: future challenges. *Drug Resist Updat*.***2***: 148-152.

Sprules, T., Kawulka, K. E., and Vederas, J. C. (2004) NMR solution structure of ImB2, a protein conferring immunity to antimicrobial activity of the type IIa bacteriocin, carnobacteriocin B2. *Biochemistry*.***43***: 11740-11749.

Stanckebrandt, E., and Teuber, M. (1988) Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria *Biochimie*.***70***: 317-324

Stein, T., Borchert, S., Kiesau, P., Heinzmann, S., Kloss, S., Klein, C., Helfrich, M., and Entian, K. D. (2002) Dual control of subtilin biosynthesis and immunity in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*.***44***: 403-416.

Stein, T., Heinzmann, S., Solovieva, I., and Entian, K. D. (2003) Function of *Lactococcus lactis* nisin immunity genes *nisI* and *nisFEG* after coordinated expression in the surrogate host *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*.***278***: 89-94.

Stein, T., Heinzmann, S., Dusterhus, S., Borchert, S., and Entian, K. D. (2005) Expression and functional analysis of the subtilin immunity genes *spaIFEG* in the subtilin-sensitive host *Bacillus subtilis* MO1099. *J Bacteriol*.***187***: 822-828.

Steinkraus, K. H. (2002) Fermentationsin World Food Processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*.***1***: 23-32.

Stephens, S. K., Floriano, B., Cathcart, D. P., Bayley, S. A., Witt, V. F., Jiménez-Díaz, R., Warner, P. J., and Ruiz-Barba, J. L. (1998) Molecular analysis of the locus responsible for production of plantaricin S, a two-peptide bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10. *Appl Environ Microbiol*.***64***: 1871-1877.

Stern, N. J., Svetoch, E. A., Eruslanov, B. V., Perelygin, V. V., Mitsevich, E. V., Mitsevich, I. P., Pokhilenko, V. D., Levchuk, V. P., Svetoch, O. E., and Seal, B. S. (2006) Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system. *Antimicrob Agents Chemother*.***50***: 3111-3116.

Stiles, M. E. (1994) Bacteriocins produced by *Leuconostoc* species. *J Dairy Sci*.***77***: 2718-2724.

Stiles, M. E. (1996) Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*.***70***: 331-345.

Stiles, M. E., and Holzapfel, W. H. (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol*.***36***: 1-29.

Stoddard, G. W., Petzel, J. P., van Belkum, M. J., Kok, J., and McKay, L. L. (1992) Molecular analyses of the lactococcin A gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis WM4. *Appl Environ Microbiol*.***58***: 1952-1961.

Straume, D., Kjos, M., Nes, I. F., and Diep, D. B. (2007) Quorum-sensing based bacteriocin production is down-regulated by N-terminally truncated species of gene activators. *Mol Genet Genomics*.***278***: 283-293.

Sutyak, K. E., Wirawan, R. E., Aroutcheva, A. A., and Chikindas, M. L. (2008a) Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilosin from the dairy product-derived *Bacillus amyloliquefaciens*. *J Appl Microbiol*.***104***: 1067-1074.

Sutyak, K. E., Anderson, R. A., Dover, S. E., Feathergill, K. A., Aroutcheva, A. A., Faro, S., and Chikindas, M. L. (2008b) Spermicidal activity of the safe natural antimicrobial peptide subtilosin. *Infect Dis Obstet Gynecol*.***2008***: 540758.

Suzuki, T., Tsuda, Y., Kanou, N., Inoue, T., Kumazaki, K., Nagano, S., Hirai, S., Tanaka, K., and Watanabe, K. (2006) *Bifidobacterium adolescentis* complete genome sequence. *National Center for Biotechnology Information World Review*.***bases 1 to 2089645***.

T

Tagg, J. R., Dajani, A. S., and Wannamaker, L. W. (1976) Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev*.***40***: 722-756.

Tagg, J. R. (2004) Prevention of streptococcal pharyngitis by anti-*Streptococcus pyogenes* bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Streptococcus salivarius*. *Indian J Med Res*.***119 Suppl***: 13-16.

Tahiri, I., Desbiens, M., Benech, R., Kheadr, E., Lacroix, C., Thibault, S., Ouellet, D., and Fliss, I. (2004) Purification, characterization and amino acid sequencing of divergicin M35: a novel class IIa bacteriocin produced by *Carnobacterium divergens* M35. *Int J Food Microbiol*.***97***: 123-136.

Taylor, G. D., Kibsey, P., Kirkland, T., Burroughs, E., and Tredget, E. (1992) Predominance of staphylococcal organisms in infections occurring in a burns intensive care unit. *Burns*.***18***: 332-335.

Tettelin, H., Masignani, V., Cieslewicz, M. J., Donati, C., Medini, D., Ward, N. L., Angiuoli, S. V., Crabtree, J., Jones, A. L., Durkin, A. S., Deboy, R. T., Davidsen, T. M., Mora, M., Scarselli, M., Margarit y Ros, I., Peterson, J. D., Hauser, C. R., Sundaram, J. P., Nelson, W. C., Madupu, R., Brinkac, L. M., Dodson, R. J., Rosovitz, M. J., Sullivan, S. A., Daugherty, S. C., Haft, D. H., Selengut, J., Gwinn, M. L., Zhou, L., Zafar, N., Khouri, H., Radune, D., Dimitrov, G., Watkins, K., O'Connor, K. J., Smith, S., Utterback, T. R., White, O., Rubens, C. E., Grandi, G., Madoff, L. C., Kasper, D. L., Telford, J. L., Wessels, M. R., Rappuoli, R., and Fraser, C. M. (2005) Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial 'pan-genome'. *Proc Natl Acad Sci U S A.* .***39***: 13950-13955.

Thomas, L. V., Clarkson, M. R., and Delves-Broughton, J. (2000) Nisin. In: Naidu, A. S. (Eds). *Natural Food Antimicrobial Systems*. CRC-Press. F. L. pp 463-524.

Thöny, B., and Hennecke, H. (1989) The -24/-12 promoter comes of age. *FEMS Microbiol Rev*.***5***: 341-357.

Tichaczek, P. S., Vogel, R. F., and Hammes, W. P. (1993) Cloning and sequencing of *curA* encoding curvacin A, the bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* LTH1174. *Arch Microbiol*.***160***: 279-283.

Tichaczek, P. S., Vogel, R. F., and Hammes, W. P. (1994) Cloning and sequencing of *sakP* encoding sakacin P, the bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* LTH 673. *Microbiology*.***140 (Pt 2)***: 361-367.

Todorov, S. D., and Dicks, L. M. (2004) Characterization of mesentericin ST99, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* ST99 isolated from boza. *J Ind Microbiol Biotechnol*.***31***: 323-329.

Todorov, S. D., and Dicks, L. M. T. (2005a) Characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from spoiled black olives. *JBasic Microbiol*.***45***: 312-322.

Todorov, S. D., and Dicks, L. M. T. (2005b) Pediocin ST18, an anti-listerial bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* ST18 isolated from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria *Process Biochemistry*.***40***: 365-370.

Todorov, S. D., Meincken, M., and Dicks, L. M. (2006c) Factors affecting the adsorption of bacteriocins ST194BZ and ST23LD to *Lactobacillus sakei* and *Enterococcus* sp. *J Gen Appl Microbiol*.***52***: 159-167.

Todorov, S. D., and Dicks, L. M. T. (2006d) Screening for bacteriocin producer lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. Comparison of the bacteriocins. *Process Biochem*.***41***.

Todorov, S. D. (2010) Diversity of bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from boza, a cereal-based fermented beverage from Bulgaria. *Food Control*.***21***: 1011-1021.

Tomita, H., Fujimoto, S., Tanimoto, K., and Ike, Y. (1996) Cloning and genetic organization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pYI17. *J Bacteriol*.***178***: 3585-3593.

Tomita, H., Fujimoto, S., Tanimoto, K., and Ike, Y. (1997) Cloning and genetic and sequence analyses of the bacteriocin 21 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pPD1. *J Bacteriol*.***179***: 7843-7855.

Trias, R., Badosa, E., Montesinos, E., and Baneras, L. (2008) Bioprotective *Leuconostoc* strains against *Listeria monocytogenes* in fresh fruits and vegetables. *Int J Food Microbiol*.***127***: 91-98.

Twomey, D., Ross, R. P., Ryan, M., Meaney, B., and Hill, C. (2002) Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie Van Leeuwenhoek*.***82***: 165-185.

U

Uteng, M., Hauge, H. H., Markwick, P. R., Fimland, G., Mantzilas, D., Nissen-Meyer, J., and Muhle-Goll, C. (2003) Three-dimensional structure in lipid micelles of the pediocin-like antimicrobial peptide sakacin P and a sakacin P variant that is structurally stabilized by an inserted C-terminal disulfide bridge. *Biochemistry*.***42***: 11417-11426.

V

van Belkum, M. J., Hayema, B. J., Jeeninga, R. E., Kok, J., and Venema, G. (1991a) Organization and nucleotide sequences of two lactococcal bacteriocin operons. *Appl Environ Microbiol*.***57***: 492-498.

van Belkum, M. J., Kok, J., Venema, G., Holo, H., Nes, I. F., Konings, W. N., and Abee, T. (1991b) The bacteriocin lactococcin A specifically increases permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independent, protein-mediated manner. *J Bacteriol*.***173***: 7934-7941.

van Belkum, M. J., Kok, J., and Venema, G. (1992) Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of lcnB, a third bacteriocin determinant from the lactococcal bacteriocin plasmid p9B4-6. *Appl Environ Microbiol*.***58***: 572-577.

van Belkum, M. J., and Stiles, M. E. (1995) Molecular characterization of genes involved in the production of the bacteriocin leucocin A from *Leuconostoc gelidum*. *Appl Environ Microbiol*.***61***: 3573-3579.

van der Meer, J. R., Rollema, H. S., Siezen, R. J., Beerthuyzen, M. M., Kuipers, O. P., and de Vos, W. M. (1994) Influence of amino acid substitutions in the nisin leader peptide on biosynthesis and secretion of nisin by *Lactococcus lactis*. *J Biol Chem*.***269***: 3555-3562.

van Heusden, H. E., de Kruijff, B., and Breukink, E. (2002) Lipid II induces a transmembrane orientation of the pore-forming peptide lantibiotic nisin. *Biochemistry*.***41***: 12171-12178.

Van Reenen, C. A., Chikindas, M. L., Van Zyl, W. H., and Dicks, L. M. (2003) Characterization and heterologous expression of a class IIa bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Food Microbiol*.***81***: 29-40.

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., and Swings, J. (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev*.***60***: 407-438.

Vaughan, A., Eijsink, V. G., O'Sullivan, T. F., O'Hanlon, K., and van Sinderen, D. (2001) An analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from malted barley. *J Appl Microbiol*.***91***: 131-138.

Venema, K., Haverkort, R. E., Abee, T., Haandrikman, A. J., Leenhouts, K. J., de Leij, L., Venema, G., and Kok, J. (1994) Mode of action of LciA, the lactococcin A immunity protein. *Mol Microbiol*.***14***: 521-532.

Vergin, F. (1954) Antibiotics and probiotics. *Hippokrates*.***25***: 116-119.

von Mollendorff, J. W., Todorov, S. D., and Dicks, L. M. (2006) Comparison of bacteriocins produced by lactic-acid bacteria isolated from boza, a cereal-based fermented beverage from the Balkan Peninsula. *Curr Microbiol*.***53***: 209-216.

W

Wang, Y., Henz, M. E., Gallagher, N. L., Chai, S., Gibbs, A. C., Yan, L. Z., Stiles, M. E., Wishart, D. S., and Vederas, J. C. (1999) Solution structure of carnobacteriocin B2 and implications for structure-activity relationships among type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biochemistry*.***38***: 15438-15447.

Ward, D. J., and Somkuti, G. A. (1995) Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ST134. *Appl Microbiol Biotechnol*.***43***: 330-335.

Watson, R. M., Woody, R. W., Lewis, R. V., Bohle, D. S., Andreotti, A. H., Ray, B., and Miller, K. W. (2001) Conformational changes in pediocin AcH upon vesicle binding and approximation of the membrane-bound structure in detergent micelles. *Biochemistry*.***40***: 14037-14046.

Weber, G. H., and Broich, W. A. (1986) Shelf-extension of cultured dairy foods. *C. Dairy Prod. J.*: 19-21.

Weiss, N., Busse, M., and Kandler, O. (1968) The origin of fermentation by-products in the lactic acid fermentation of *Lactobacillus acidophilus*. *Arch Mikrobiol*.***62***: 85-93.

Wescombe, P. A., and Tagg, J. R. (2003) Purification and characterization of streptin, a type A1 lantibiotic produced by *Streptococcus pyogenes*. *Appl Environ Microbiol*.***69***: 2737-2747.

Whitford, M. F., McPherson, M. A., Forster, R. J., and Teather, R. M. (2001) Identification of bacteriocin-like inhibitors from rumen *Streptococcus* spp. and isolation and characterization of bovicin 255. *Appl Environ Microbiol*.***67***: 569-574.

Widdick, D. A., Dodd, H. M., Barraille, P., White, J., Stein, T. H., Chater, K. F., Gasson, M. J., and Bibb, M. J. (2003) Cloning and engineering of the cinnamycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces cinnamoneus cinnamoneus* DSM 40005. *Proc Natl Acad Sci U S A*.***100***: 4316-4321.

Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, O. P., Bierbaum, G., de Kruijff, B., and Sahl, H. G. (2001) Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J Biol Chem*.***276***: 1772-1779.

Wiedemann, I., Bottiger, T., Bonelli, R. R., Wiese, A., Hagge, S. O., Gutsmann, T., Seydel, U., Deegan, L., Hill, C., Ross, P., and Sahl, H. G. (2006) The mode of action of the lantibiotic lacticin 3147--a complex mechanism involving specific interaction of two peptides and the cell wall precursor lipid II. *Mol Microbiol*.***61***: 285-296.

Wirawan, R. E., Swanson, K. M., Kleffmann, T., Jack, R. W., and Tagg, J. R. (2007) Uberolysin: a novel cyclic bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. *Microbiology*.***153***: 1619-1630.

Wirjantoro, T. I., Lewis, M. J., Grandison, A. S., Williams, G. C., and Delves-Broughton, J. (2001) The effect of nisin on the keeping quality of reduced heat-treated milks. *J Food Prot*.***64***: 213-219.

Woese, C. R., Kandler, O., and Wheelis, M. L. (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A*.***87***: 4576-4579.

Wong, A. C. (1998) Biofilms in food processing environments. *J Dairy Sci*.***81***: 2765-2770.

Worobo, R. W., Henkel, T., Sailer, M., Roy, K. L., Vederas, J. C., and Stiles, M. E. (1994) Characteristics and genetic determinant of a hydrophobic peptide bacteriocin, carnobacteriocin A, produced by *Carnobacterium piscicola* LV17A. *Microbiology*.***140 (Pt 3)***: 517-526.

Worobo, R. W., Van Belkum, M. J., Sailer, M., Roy, K. L., Vederas, J. C., and Stiles, M. E. (1995) A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *J Bacteriol*.***177***: 3143-3149.

X

Xiao, H., Chen, X., Chen, M., Tang, S., Zhao, X., and Huan, L. (2004) Bovicin HJ50, a novel lantibiotic produced by *Streptococcus bovis* HJ50. *Microbiology*.***150***: 103-108.

Xie, L., and van der Donk, W. A. (2004) Post-translational modifications during lantibiotic biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol*.***8***: 498-507.

Xue, J., Hunter, I., Steinmetz, T., Peters, A., Ray, B., and Miller, K. W. (2005) Novel activator of mannose-specific phosphotransferase system permease expression in *Listeria innocua*, identified by screening for pediocin AcH resistance. *Appl Environ Microbiol*.***71***: 1283-1290.

Y

Yamamoto, Y., Togawa, Y., Shimosaka, M., and Okazaki, M. (2003) Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* strain RJ-11. *Appl Environ Microbiol*.***69***: 5746-5753.

Yamazaki, K., Suzuki, M., Kawai, Y., Inoue, N., and Montville, T. J. (2005) Purification and characterization of a novel class IIa bacteriocin, piscicocin CS526, from surimi-associated *Carnobacterium piscicola* CS526. *Appl Environ Microbiol*.***71***: 554-557.

Yang, L., Harroun, T. A., Heller, W. T., Weiss, T. M., and Huang, H. W. (1998) Neutron off-plane scattering of aligned membranes. I. Method Of measurement. *Biophys J*.***75***: 641-645.

Yoneyama, F., Imura, Y., Ichimasa, S., Fujita, K., Zendo, T., Nakayama, J., Matsuzaki, K., and Sonomoto, K. (2009a) Lacticin Q, a lactococcal bacteriocin, causes high-level membrane permeability in the absence of specific receptors. *Appl Environ Microbiol*.***75***: 538-541.

Yoneyama, F., Imura, Y., Ohno, K., Zendo, T., Nakayama, J., Matsuzaki, K., and Sonomoto, K. (2009b) Peptide-lipid huge toroidal pore, a new antimicrobial mechanism mediated by a lactococcal bacteriocin, lacticin Q. *Antimicrob Agents Chemother*.***53***: 3211-3217.

Z

Zaunmüller, T., Eichert, M., Richter, H., and Unden, G. (2006) Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids. *Appl Microbiol Biotechnol*.***72***: 421-429.

Zendo, T., Fukao, M., Ueda, K., Higuchi, T., Nakayama, J., and Sonomoto, K. (2003) Identification of the lantibiotic nisin Q, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. *Biosci Biotechnol Biochem*.***67***: 1616-1619.

Zendo, T., Koga, S., Shigeri, Y., Nakayama, J., and Sonomoto, K. (2006) Lactococcin Q, a novel two-peptide bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* QU 4. *Appl Environ Microbiol*.***72***: 3383-3389.

Zorba, M., Hancioglu, O., Genc, M., Karapinar, M., and Ova, G. (2003) The use of starter cultures in the fermentation of boza, a traditional Turkish beverage. *Process Biochem* ***38***: 1405-1411.

Zouhir, A., Hammami, R., Fliss, I., and Hamida, J. B. (2010) A new structure-based classification of gram-positive bacteriocins. *Protein J*.***29***: 432-439.