



**HAL**  
open science

# Caractérisation de l'activité contre les bactéries à Gram-négatif, expression hétérologue et étude de la relation structure activité des bactériocines produites par *Lacticaseibacillus paracasei* CNCM I-5369

Désiré Madi Moussa

► **To cite this version:**

Désiré Madi Moussa. Caractérisation de l'activité contre les bactéries à Gram-négatif, expression hétérologue et étude de la relation structure activité des bactériocines produites par *Lacticaseibacillus paracasei* CNCM I-5369. Agronomie. Université de Lille, 2021. Français. NNT : 2021LILUR060 . tel-03917137

**HAL Id: tel-03917137**

**<https://theses.hal.science/tel-03917137>**

Submitted on 1 Jan 2023

**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.



Ecole doctorale Science de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement  
Unité Mixte de Recherche Transfrontalière BioEcoAgro 1158

**THESE DE DOCTORAT**  
EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE, SCIENCES ET TECHNOLOGIES**  
Spécialité : Biotechnologies agroalimentaires, sciences de l'aliment, physiologie

---

Présentée et soutenue le 16 décembre 2021 par

**Désiré MADI MOUSSA**

**Caractérisation de l'activité contre les bactéries à Gram-négatif,  
expression hétérologue et étude de la relation structure activité des  
bactériocines produites par *Lacticaseibacillus paracasei* CNCM I-5369**

---

**Composition du Jury :**

- M. Ismail Fliss, Professeur, Université de Laval (Canada), Rapporteur  
Mme Séverine Zirah, Maître de conférences-HDR, Muséum National d'Histoire Naturelle, Rapporteur  
M. Marc Maresca, Maître de conférences, Université d'Aix-Marseille, Examineur  
M. Abdellah Benachour, Professeur, Université de Caen, Examineur  
Mme Aurélie Tasiemski, Maître de conférences-HDR, Université de Lille, Examinatrice  
Mme Valérie Leclère, Professeure, Université de Lille, Présidente  
M. Yanath Belguesmia, Ingénieur de recherche, Université de Lille, Invité  
Mme Françoise Coucheney, Maître de conférences, Université de Lille, Co-encadrante de thèse  
M. Djamel Drider, Professeur, Université de Lille, Directeur de thèse

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur **Ismail Fliss** et la Docteure **Séverine Zirah** d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Je remercie également les Professeurs **Valérie Leclère** et **Abdellah Benachour** ainsi que les Docteurs **Aurélie Tasiemski** et **Marc Maresca** d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examineurs et d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je remercie également les Professeurs **Sylvie Rebuffat**, **Oscar Kuipers** et **Rabah Boukherroub** ainsi que la Docteure **Karine Blondeau** pour avoir accepté de suivre mon travail en étant membre de mon comité de suivi de thèse. Je vous remercie tous pour vos conseils et orientations lors de nos discussions. Je remercie plus particulièrement Karine Blondeau, d'avoir cru en moi en me prenant en stage en Master 1, en m'acceptant dans son Master 2 et me reprenant en tant qu'assistant ingénieur pour travailler à ses côtés. Tous ses conseils, ses remarques pertinentes et sa grande disponibilité m'ont aidé à murir, à progresser et acquérir les compétences nécessaires pour faire cette thèse. Je lui serai toujours reconnaissant.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à mon directeur de thèse, le Professeur **Djamel Drider**, d'avoir cru en moi et d'avoir accepté de me prendre en thèse. Ces trois dernières années, Djamel Drider a dirigé mes travaux de thèse en faisant preuve d'immenses qualités humaines et scientifiques tout en se rendant très disponible. Ses compétences, sa rigueur scientifique, sa lucidité et sa grande expérience m'ont beaucoup appris. Il a toujours pris le temps nécessaire pour partager ses idées tout en me laissant la liberté d'entreprendre mes propres démarches scientifiques. De plus, il n'a jamais cessé de m'encourager, de me conseiller et d'être objectif. Je lui serai toujours reconnaissant.

Je remercie ma co-encadrante, la Docteure **Françoise Coucheney**, pour m'avoir encadré, encouragé et soutenu durant ces trois années de thèses. Ses compétences et ses précieuses remarques m'ont permis de progresser. Je lui exprime ma profonde gratitude.

Je tiens également à remercier les docteurs **Yanath Belguesmia**, **Rabia Ladjouzi** et **Adrián Pérez-Ramos** pour leur entière disponibilité, leur soutien et leurs conseils précieux qui m'ont permis de bien avancer dans ma thèse et je vous remercie pour votre bonne humeur et votre sympathie. Je te remercie Rabia pour ta gentillesse et j'espère qu'un jour tu deviendras un meilleur footballeur que je l'ai été dans le passé. Je te remercie Yanath pour tes conseils sur la vie et j'espère qu'un jour on pourra partager un bon Triolo. Quant à Adrián, je te remercie de

m'avoir fait découvrir le plaisir d'arroser l'arbre mondiale et j'espère qu'un jour tu pourras utiliser ta nouvelle « chaise ».

Je tiens à remercier particulièrement Dahlia et Rezak (#la team de base) pour leur sympathie, leurs encouragements ainsi que pour tous les bons moments et les délires que l'on a partagé ensemble. Je vous remercie également pour vos plats (Maamouls aux dattes, couscous royal...) et j'espère que bientôt on pourra retourner au Dôme 33. Je vous souhaite plus de chances dans vos paris sportifs en particulier à toi Rezak (alias le Chat Noir).

Je remercie également Liza, Nacim, Nathalie, Jonhatan, Nuria, Camila, Ali, Adrien, Barbara, Mouna, Mira, Radja, Hassan, ainsi que tous les autres que je n'ai pas pu citer, pour leurs sympathies, leurs bonnes humeurs et les moments de partage.

Je remercie également tous les membres du personnel de l'UMRT BioEcoAgro pour leurs sympathies, leurs conseils et leur disponibilité.

Je remercie également le laboratoire « Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes » pour m'avoir autorisé à réaliser des expérimentations de dichroïsme circulaire ainsi que le laboratoire « Fonction et Architecture des Assemblages Macromoléculaires » pour m'avoir autorisé à réaliser des essais de cristallogenèse de ma bactériocine.

Je remercie l'Ecole Doctorale Science de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement ainsi que la région Hauts de France pour avoir financé ma thèse.

Je remercie également ma petite amie, Laureen Dong, pour sa patience, son soutien et ses encouragements surtout pendant la période de rédaction, car sans toi ça aurait été beaucoup plus dur. Je remercie également sa famille pour leur accueil chaleureux à chaque fois que je suis allé chez eux.

Et enfin j'adresse toute mon affection à ma famille, mes frères et sœurs ainsi que mes parents pour avoir toujours cru en moi, de m'avoir soutenu et encouragé, plus particulièrement à **mon père** qui m'a accompagné et conseillé tout au long de mes études. De plus il m'a toujours poussé à me dépasser, d'ailleurs si aujourd'hui je suis arrivé à ce stade, c'est en grande partie grâce à lui et c'est pour cela que je lui dédie ma thèse.



## Résumé

L'usage abusif et excessif des antibiotiques a exacerbé le phénomène d'antibiorésistance, à travers la planète. Aujourd'hui, la lutte contre l'antibiorésistance est devenue une priorité mondiale en matière de santé publique. En effet, chaque année, elle est responsable de plus de 700,000 décès dans le monde et d'ici 2050, elle causera plus de 10 millions de décès par an, si des actions concrètes ne sont pas mises en place afin de freiner le développement de ce phénomène. En plus des pertes humaines, le coût financier des soins afférents à l'antibiorésistance pourra atteindre 100,000 milliards de dollars dans le monde. Pour faire face à cette crise annoncée, plusieurs stratégies innovantes, parmi lesquelles l'usage des peptides antimicrobiens (PAMs), ont été proposées. Dans cette perspective, les bactériocines, qui sont des PAMs synthétisés par voie ribosomique pourraient contribuer à la solution thérapeutique. Récemment, la souche *Lactocaseibacillus paracasei* CNCM I-5369 s'est particulièrement distinguée pour son activité contre des germes pathogènes à Gram-négatif. Cette activité est due à 5 nouvelles bactériocines codées par des gènes chromosomiques *orf010*, *orf012*, *orf023*, *orf030* et *orf038*. Toutefois, l'activité est pH-dépendante, c'est-à-dire qu'elle est exercée, uniquement à une valeur de pH  $\leq 5$ . Dans le cadre de cette thèse, nous avons dans un premier temps, vérifiée l'expression de ces gènes lors de la croissance de la bactérie, en utilisant la technique de qPCR. Ainsi, nous avons observé que ces 5 gènes sont exprimés après 24 h de croissance, de façon concomitante à l'apparition de l'activité antimicrobienne indiquant ainsi un lien entre l'expression génique et la production des cinq bactériocines. Ces 5 bactériocines ont été exprimées en système hétérologue chez *Escherichia coli* Rosetta. Seule la bactériocine codée par *orf030*, appelée lacticaséicine 30, a pu être produite en grande quantité, contrairement aux autres bactériocines qui ont été produites mais demeurent piégées dans la fraction insoluble. Dans un deuxième temps, nous avons étudié la relation entre la structure de la lacticaséicine 30 et son activité contre les bactéries à Gram-négatif. Les prédictions de structure ont suggéré une organisation en 5 hélices  $\alpha$  de la lacticaséicine 30. La proportion d'hélice- $\alpha$  était plus importante à pH 5 qu'à pH 7. Pour identifier les régions impliquées dans l'activité contre les bactéries à Gram-négatif, nous avons produit des peptides dérivés de la lacticaséicine 30 par une approche de biologie moléculaire. Ces peptides dérivés sont obtenus en réduisant leurs tailles, ou en insérant des mutations ciblées dans différentes régions. Ainsi, nous avons généré des formes plus courtes de la lacticaséicine 30, contenant soit sa région N-terminale (acides aminés 1 à 39), soit les régions centrale et C-terminale (acides aminés 40 à 111). De la même manière, un peptide dérivé contenant uniquement la première hélice de la région N-terminale a été également produit. Les mutations introduisant des substitutions des acides aminés ont été introduites au sein des hélices- $\alpha$ . Au regard de leurs activités, ces peptides dérivés ont permis de localiser l'activité antibactérienne essentiellement dans la région N-terminale, et nécessite à minima deux hélices- $\alpha$ . Par ailleurs, l'activité de ces variants peptidiques E32G, T33P, T52P et D57G reste sensiblement identique, contrairement à celles des variants E6G, T7P, D57G T52P, A74P, Y78S, Y93S et A97P qui ont été significativement altérées. Dans la dernière partie, nous avons testé l'activité de la lacticaséicine 30 contre un panel de souches cliniques à Gram-négatif et portant des résistances à la colistine. Les résultats obtenus ont mis en lumière une synergie entre la lacticaséicine 30 et la colistine et la réduction significative de l'expression des gènes *mcr-1* et *mcr-9*, responsables de la résistance à la colistine.

**Mots clés** : Bactériocine, activité antimicrobienne, expression hétérologue, relation structure-activité, expression de gènes, colistine.

## Abstract

The excessive use of antibiotics has exacerbated the phenomenon of antibiotic resistance throughout the world. Today, the fight against antibiotic resistance has become a global public health priority. Indeed, every year, it is responsible for more than 700,000 deaths in the world and by 2050, it will cause more than 10 million deaths per year, if concrete actions are not implemented to curb the development of this phenomenon. In addition to the human losses, the financial cost of antibiotic resistance-related care could reach 100,000 billion dollars worldwide. To face this crisis, several innovative strategies, including the use of antimicrobial peptides (AMPs), have been proposed. In this perspective, bacteriocins, which are ribosomally APMs, could contribute to the therapeutic solution. Recently, the *Lacticaseibacillus paracasei* CNCM I-5369 strain has been particularly distinguished for its activity against Gram-negative pathogens. This activity is due to 5 new bacteriocins encoded by chromosomal genes *orf010*, *orf012*, *orf023*, *orf030* and *orf038*. However, the activity is pH-dependent, i.e., it is exerted, only at a pH value  $\leq 5$ . In the framework of this thesis, we first verified the expression of these genes during the growth of the bacteria, using the qPCR technique. Thus, we observed that these 5 genes were expressed after 24 h of growth, concomitantly with the appearance of antimicrobial activity indicating a possible link between gene expression and the production of the five bacteriocins. These 5 bacteriocins were expressed in a heterologous system in *Escherichia coli* Rosetta. It should be noted that only the bacteriocin encoded by *orf030*, called lacticaseicin 30, could be produced in large quantities, in contrast to the other bacteriocins which were produced but remain trapped in the insoluble fraction. In a second step, we investigated the relationship between the structure of lacticaseicin 30 and its activity against Gram-negative bacteria. Structural predictions suggested a 5-helix organization of lacticaseicin 30. The proportion of helix- $\alpha$  was greater at pH 5 than at pH 7. To identify the regions involved in the activity against Gram-negative bacteria, we produced lacticaseicin 30-derived peptides by a molecular biology approach. These derived peptides are obtained by reducing their sizes, or by inserting targeted mutations in different regions. Thus, we generated shorter forms of lacticaseicin 30, containing either its N-terminal region (amino acids 1 to 39), or the central and C-terminal regions (amino acids 40 to 111). Similarly, a derivative peptide containing only the first helix of the N-terminal region was also produced. Mutations introducing amino acid substitutions were introduced within the  $\alpha$ -helices. With regard to their activities, these derived peptides localized antibacterial activity mainly in the N-terminal region, and requires at least two helix- $\alpha$ s. Furthermore, the activity of these peptide variants E32G, T33P, T52P, and D57G remained essentially the same, unlike to those of the variants E6G, T7P, D57G T52P, A74P, Y78S, Y93S, and A97P, which were significantly impaired. In the last part, we tested the activity of lacticaseicin 30 against a panel of Gram-negative clinical strains with colistin resistance. The results obtained highlighted a synergy between lacticaseicin 30 and colistin and a significant reduction of the expression of the *mcr-1* and *mcr-9* genes, responsible for colistin resistance.

**Keywords:** bacteriocin, antimicrobial activity, heterologous expression, structure-activity relationship, gene expression, colistin.

## Valorisation scientifique

### Publications

[1] **Désiré Madi-Moussa**, Françoise Coucheney and Djamel Drider (2021). “Expression of five class II bacteriocins with activity against *Escherichia coli* in *Lacticaseibacillus paracasei* CNCM I 5369, and in a heterologous host”. *Biotechnology Reports*. v. 30, pp. e00632. doi: 10.1016/j.btre.2021.e00632 (**publié**).

[2] Adrián Pérez-Ramos †, **Désiré Madi-Moussa** †, Françoise Coucheney and Djamel Drider (2021). “Current Knowledge of the Mode of Action and Immunity Mechanisms of LAB-Bacteriocins”. *Microorganisms*. doi:10.3390/microorganisms9102107. (**publié**).

[3] **Désiré Madi-Moussa**, Yanyan Li, Françoise Coucheney, Sylvie Rebuffat and Djamel Drider. “Insights into the structure-activity relationships of a bacteriocin produced by *Lacticaseibacillus paracasei* CNCM I-5369 acting specifically against Gram-negative bacteria”. (**en cours de soumission dans « Journal of Biological Chemistry »**).

[4] **Désiré Madi-Moussa**, Yanath Belguesmia, Audrey Charlet, Djamel Drider and Françoise Coucheney. Lacticaseicin 30 and colistin as a novel antibiotic formulation against Gram-negative  $\beta$ -lactamase producing strains and colistin resistant strains. **Antibiotics**. doi.org/10.3390/antibiotics11010020. (**publié**).

### Communication écrite

**Désiré Madi-Moussa**, Françoise Coucheney and Djamel Drider. “Characterization of an anti-*Escherichia coli* activity from of a new class II bacteriocin produced by *Lacticaseibacillus paracasei* CNCM I-5369”. Congrès de la Société Française de Microbiologie, du 22 au 24 septembre 2021, Nantes (France).

### Communication orale

**Désiré Madi-Moussa** “ Caractérisation d'une nouvelle bactériocine de classe II ayant une activité anti-*Escherichia coli* produite par *Lacticaseibacillus paracasei* CNCM I-5369”. Congrès de la Société Française de Microbiologie, 24 septembre 2021, Nantes (France).

## Liste des abréviations

ABC: ATP-Binding Cassette

AMPs ou PAMs: peptides antimicrobiens

Amp : ampicilline

Amp<sup>r</sup> : résistant à l'ampicilline

AU : arbitrary Units (unité arbitraire)

Bl et LAB: bactérie lactique

Da : Dalton

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

ERV : entérocoques résistants à la vancomycine

FAO : Food and Agriculture Organization (Organisation pour l'alimentation et l'agriculture)

IPTG: Isopropyl  $\beta$ - D-1-thiogalactopyranoside

LB : milieu Luria Bertani

LPS : lipopolysaccharide

GRAS : Generally Recognized As Safe

mcr : mobilized colistin resistance (résistance à la colistine mobilisé)

MIC : Minimum inhibitory concentrations (concentration minimale inhibitrice)

MRS : milieu Man, Rogosa et Sharpe

OMS: Organisation mondiale de la santé

orf: open reading frame (cadre ouvert de lecture)

pb : paire de base

PCR : polymerase chain reaction

pI : point isoélectrique

qPCR : PCR quantitative

RiPPs : Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide

QS: quorum sensing

SARM: *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

SDS-PAGE : sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (gel d'électrophorèse de dodécylsulfate de sodium)

Tris : tris- (hydroxyméthyl)-aminométhane

TRX : thiorédoxine

U.S. FDA : United States food and drug administration (administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments)

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Mode d'action des antibiotiques.....	2
<b>Figure 2.</b> Nombre de nouveaux antibiotiques approuvés par l'administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments (U.S. FDA) par période de cinq ans. ....	4
<b>Figure 3.</b> Nombre de décès associés à l'antibiorésistance dans le monde en 2050, par rapport aux autres grandes causes de mortalité.....	4
<b>Figure 4.</b> Mécanisme de quorum sensing chez les bactéries. ....	12
<b>Figure 5.</b> Schéma représentatif et simplifié d'un bactériophage. ....	13
<b>Figure 6.</b> Les deux types de bactériophages (lytiques, tempérés) et leurs cycles associés (lytique et lysogénique) .....	15
<b>Figure 7.</b> Principaux mécanismes d'action des probiotiques. ....	18
<b>Figure 8.</b> Exemples de mécanismes d'actions des microcines en fonctions de leurs classes..	21
<b>Figure 9.</b> Modèle putatif de formation de pores par la colicine. ....	24
<b>Figure 10 :</b> Biosynthèse des bactériocines circulaires. ....	28
<b>Figure 11 .</b> Régulation de la production des bactériocines par Quorum Sensing. ....	65
<b>Figure 12 .</b> Schéma du vecteur d'expression de la divércine. ....	66
<b>Figure 13.</b> Identification des cinq gènes de bactériocines de classe II chez <i>L. paracasei</i> CNCM I-5369 à l'aide de Bagel4. ....	72
<b>Figure 14.</b> Blast des séquences protéiques des bactériocines de <i>L. paracasei</i> CNCM I-5369 sur Bagel4.....	73
<b>Figure 15.</b> Comparaison des séquences peptidiques de l'ORF010 et l'ORF023 réalisée à l'aide du logiciel Uniprot. ....	74

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Exemples d'adhésines associées à des maladies chez l'homme .....	9
<b>Tableau 2.</b> Exemple de toxines bactériennes associées à des maladies chez l'Homme.....	10
<b>Tableau 3.</b> Exemple de formulations de probiotiques commercialisées .....	17
<b>Tableau 4.</b> Nombre de peptide antimicrobien en fonction des règnes. ....	19
<b>Tableau 5.</b> Caractéristiques biochimiques des bactériocines de <i>L. paracasei</i> CNCM I-5369, déterminés à l'aide du logiciels Expasy .....	73

## Table des matières

Remerciements .....	II
Résumé .....	IV
Abstract .....	V
Valorisation scientifique .....	VI
Liste des abréviations .....	VII
Liste des figures .....	IX
Liste des tableaux .....	IX
Introduction générale .....	1
Etude Bibliographique .....	7
1. Quelles alternatives thérapeutiques à mettre en place pour lutter contre le phénomène d'antibiorésistance .....	8
1.1. La thérapie d'anti-virulence .....	8
1.1.1. Cible de l'attachement et de la colonisation microbienne .....	9
1.1.2. Altération ou destruction de la production de toxine .....	10
1.1.3. Perturbation de la régulation de l'expression des gènes de virulence .....	11
1.2. La thérapie phagique (phagothérapie) .....	13
1.2.1. Structure et mécanismes d'action des phages .....	13
1.2.2. Potentiel thérapeutique des phages .....	15
1.3. Utilisation des probiotiques .....	17
1.4. Les peptides antimicrobiens .....	19
2. Les bactériocines .....	19
2.1. Les bactériocines produites par les bactéries à Gram-négatif .....	20
2.1.1. Les microcines .....	20
2.1.2. Les colicines .....	22
2.2. Les bactériocines produites par les bactéries à Gram-positif .....	25
3. Classification des bactériocines produites par les bactéries lactiques .....	26
3.1. Classe I, les peptides synthétisés par voie ribosomale et ayant subi une modification post-traductionnelle (RiPPs) .....	26
3.1.1. Les lantibiotiques .....	26
3.1.2. Les bactériocines circulaires .....	27
3.2. Classe II, bactériocines non modifiées de faible masse moléculaire (moins de 10 kDa) ..	29
3.2.1. Bactériocines de classe IIa, ou bactériocines de type pédiocine (Pediocin-like) .....	29
3.2.2. Bactériocines de classe IIb, ou bactériocines à deux peptides .....	30

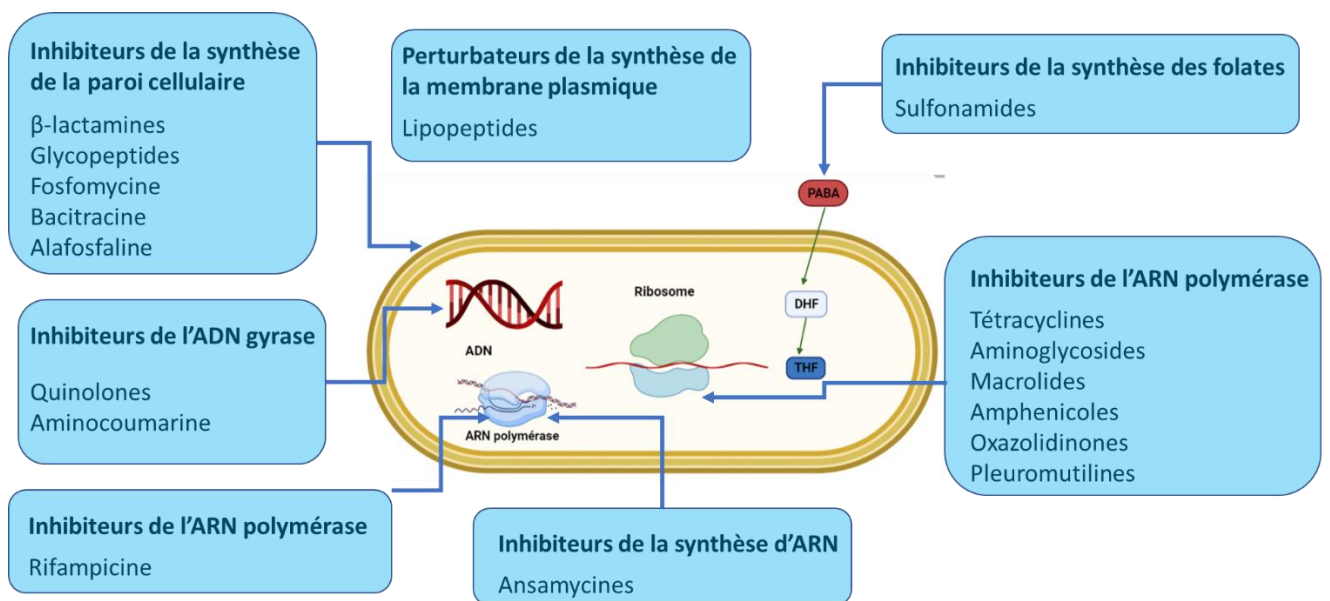
3.2.3. Classe IIc, bactériocines sans séquence leader .....	31
3.2.4. Classe II d, bactériocines mono-peptidique .....	31
3.3. Classe III, bactériocines non modifiées de plus de 10 kDa avec un mécanisme d'action bactériolytique ou non lytique .....	31
4. Les principaux modes d'action et les mécanismes d'immunité des bactériocines produites par les bactéries lactiques .....	32
Publication 1 : Connaissance actuelle des modes d'action et des mécanismes d'immunité des bactériocines produites par les BLs.....	34
5. Applications des bactériocines produites par les bactéries lactiques.....	61
5.1. Utilisation des bactériocines en agroalimentaire.....	61
5.2. Applications thérapeutiques des bactériocines en santé humaine et en médecine vétérinaire animale .....	62
5.3. Multifonction des bactériocines.....	63
6. Expression des bactériocines produites par les bactéries lactiques .....	64
OBJECTIFS DE L'ETUDE .....	67
Chapitre 1 : Expression des bactériocines de <i>Lactocaseibacillus paracasei</i> CNCM I-5369 ayant une activité contre <i>Escherichia coli</i> , en système natif et hétérologue .....	70
RESUME .....	71
Caractérisation <i>in silico</i> des bactériocines de classe II de <i>Lactocaseibacillus paracasei</i> CNCM I-5369.....	72
Publication 2 : Expression des cinq bactériocines de classe II ayant une activité contre <i>Escherichia coli</i> dans <i>Lactocaseibacillus paracasei</i> CNCM I-5369, et dans un hôte hétérologue.....	75
Chapitre 2 : Etude de la relation structure-activité de la lacticaséicine 30.....	84
RESUME .....	85
Publication 3 : Etude de la relation structure-activité d'une bactériocine produite par <i>Lactocaseibacillus paracasei</i> CNCM I-5369 ayant une activité spécifique contre les bactéries à Gram-négatif.....	87
Chapitre 3 : Application de la combinaison de la lacticaséicine 30-colistine contre des souches cliniques d'entérobactéries affichant une résistance à la colistine .....	113
Résumé.....	114
Publication 4 : Lacticaséicin 30-colistine, nouvelle formulation d'antibiotique contre les bactéries à Gram-négatif productrices de $\beta$ -lactamase et résistantes à la colistine.....	115
Discussion générale.....	130
Conclusion et perspectives.....	137
Références bibliographiques .....	141



## **Introduction générale**

General introduction

La découverte de la pénicilline par Alexandre Fleming en 1928, de la gramicidine par René Dubos et des premiers antibiotiques synthétiques, ont fortement contribué dans la lutte contre de nombreuses maladies provoquées par des infections bactériennes et qui étaient considérées comme incurables. Depuis, l'utilisation de ces molécules antibactériennes produites par différents microorganismes n'a fait qu'augmenter (Mohr, 2016). A ce jour, il existe une grande variété d'antibiotiques pouvant être classés selon leurs origines, leurs natures chimiques, leurs mécanismes d'action et leurs spectres d'action. Ces molécules ont la capacité de tuer (effet bactéricide) ou limiter la multiplication (effet bactériostatique) des bactéries. Par exemple les antibiotiques appartenant à la famille des  $\beta$ -lactamines (les pénicillines, les céphalosporines...), et les glycopeptides (la vancomycine, la teicoplanine...) vont inhiber la synthèse de la paroi bactérienne en se fixant sur des enzymes indispensables à la synthèse du peptidoglycane (transpeptidases, transglycosylases et carboxypeptidases). Tandis que d'autres antibiotiques vont entraver la synthèse des protéines soit en interférant avec la traduction de l'ARNm ou alors en inhibant la formation des chaînes peptidiques, c'est le cas notamment des aminosides (gentamicine, kanamycine...) et des macrolides (azithromycine...) (**Fig. 1**) (Kapoor et al., 2017).



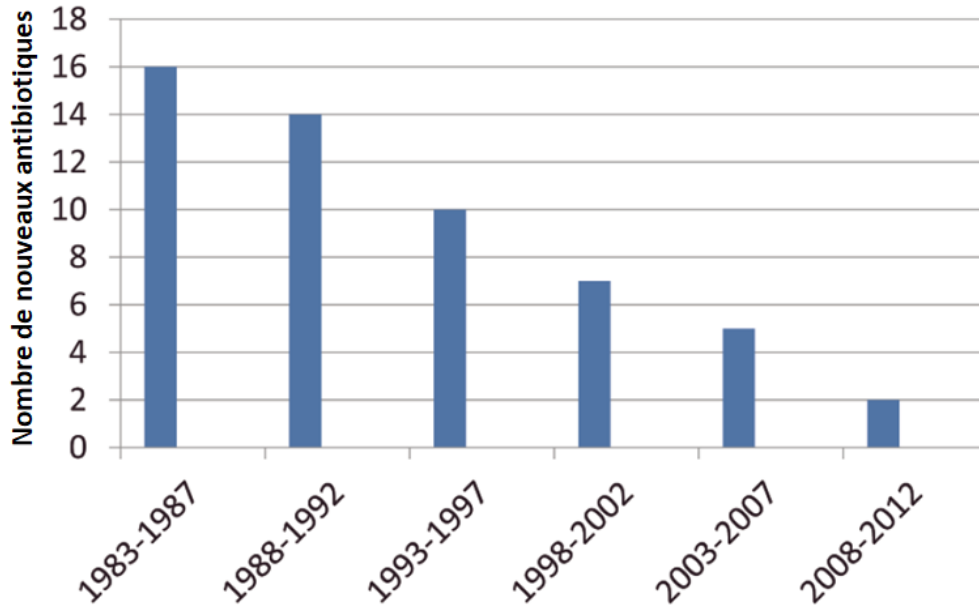
**Figure 1.** Mode d'action des antibiotiques (Sanseverino et al., 2018).

L'usage massif des antibiotiques et leur prescription inappropriée ont conduit à l'apparition et au développement de mécanismes de résistance envers ces molécules. Ces dernières années, de nombreux agents pathogènes bactériens associés aux épidémies ont évolué vers des formes multirésistantes. C'est le cas des bactéries responsables d'infections respiratoires et cutanées

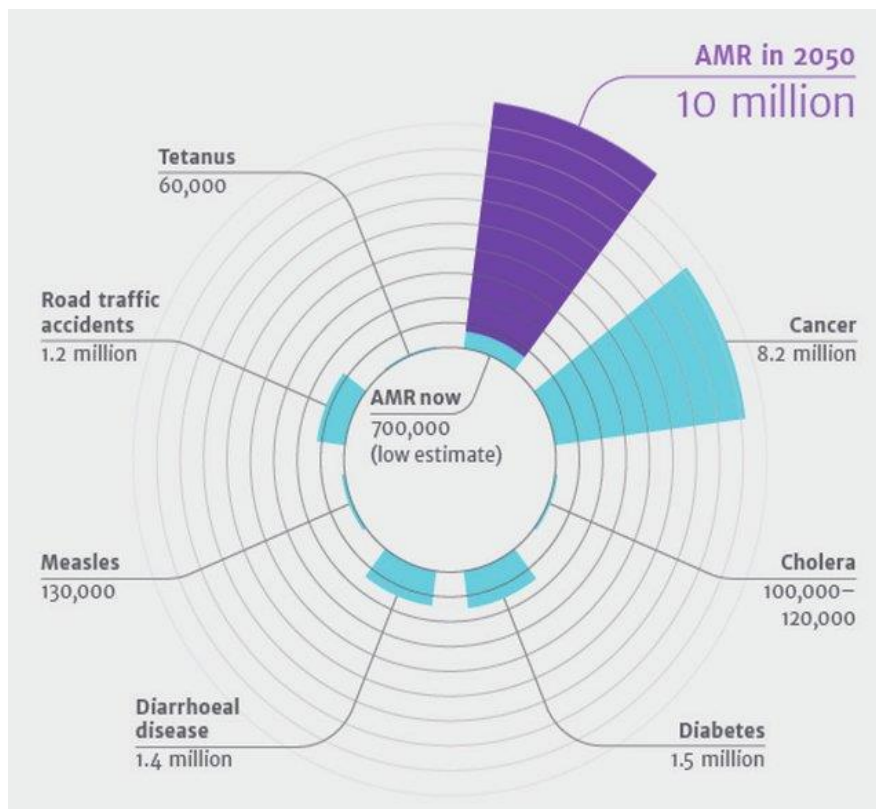
(telles que *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* et les staphylocoques) et des bactéries responsables d'infections urinaires et de septicémies (telles que *Enterobacteriaceae* et *Pseudomonas*) qui sont désormais résistantes à pratiquement tous les anciens antibiotiques (Frieri et al., 2017). Cette résistance peut être causée par une mutation génétique affectant le chromosome bactérien ou par l'acquisition de matériels génétiques exogènes (plasmide, transposon...) portant un ou plusieurs gènes de résistance provenant d'une autre espèce bactérienne. Elle peut se traduire par différents mécanismes tels que la production d'une enzyme modifiant ou détruisant l'antibiotique ou bien par une modification de la cible de l'antibiotique (Blair et al., 2015).

Parmi les antibiotiques d'importance majeure, la colistine est actuellement considérée comme un antibiotique de dernier recours pour traiter un nombre croissant d'infections dues à des bactéries à Gram-négatif multirésistantes. Cette molécule, connue aussi sous le nom de polymixin E, présente une excellente activité contre les bactéries à Gram-négatif multirésistantes, y compris *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et les bacilles non-fermentants comme *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*. Le mode d'action de la colistine consiste à déplacer de manière compétitive les cations divalents des lipides membranaires en se liant au lipide A (endotoxine) du lipopolysaccharide (LPS) de la membrane externe des bactéries à Gram-négatif. Cette interaction électrostatique entre la colistine chargée positivement et le LPS chargé négativement perturbe la membrane externe en entraînant une fuite du contenu intracellulaire, causant par voie de conséquence la mort de la bactérie (Olaitan et al., 2014). Le statut de la colistine comme antibiotique de dernier recours commence à être remis en question suite à l'émergence des bactéries résistantes. Cette résistance est liée à la présence d'un gène de nature plasmidique responsable de la résistance à la colistine est couramment appelé gène *mcr* (Mendelson et al., 2018).

La résistance aux antibiotiques est associée à une diminution rapide du nombre d'antibiotiques efficaces en thérapeutique. Depuis leur avènement et au fil des années, la découverte de nouveaux antibiotiques n'a fait que diminuer (**Fig. 2**). Le développement de nouvelles molécules antibiotiques est devenu un investissement peu attractif compte tenu du temps et de l'argent à y consacrer, contrairement aux médicaments utilisés contre les maladies chroniques qui sont plus intéressantes d'un point de vue financier pour les grandes industries pharmaceutiques.



**Figure 2.** Nombre de nouveaux antibiotiques approuvés par l'administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments (U.S. FDA) par période de cinq ans (Guidos, 2011).



**Figure 3.** Nombre de décès associés à l'antibiorésistance dans le monde en 2050, par rapport aux autres grandes causes de mortalité selon le rapport de Jim O'Neill (2016).

La résistance aux antibiotiques (antibiorésistance) est devenue une priorité mondiale en matière de santé publique. Chaque année, elle est responsable de 700 000 décès dans le monde et d'ici 2050, elle causera plus de 10 millions de décès par an (**Fig. 3**). En plus du coût en vies humaines,

le coût financier s'élèvera à plus de 100 000 milliards de dollars dans le monde (Jim O'Neill, 2016). Selon un rapport établi par le ministère des solidarités et de la santé, chaque année, en France, 160 000 patients contractent une infection par une bactérie multirésistante aux antibiotiques, et plus de 12 500 patients en meurent (<https://solidarites-sante.gouv.fr/>).

Pour l'organisation mondiale de la santé (OMS), la lutte contre la résistance aux antibiotiques est une priorité absolue. À ce titre, un plan d'action mondial de lutte contre ce phénomène a été approuvé par l'assemblée mondiale de la santé en mai 2015 (<https://www.who.int/fr/>). Ce plan s'articule autour de cinq objectifs stratégiques suivants :

- Améliorer la sensibilisation et la compréhension du phénomène de résistance aux antibiotiques en faisant un travail de pédagogie.
- Renforcer la surveillance et la recherche.
- Réduire le nombre d'incidences des infections.
- Optimiser l'usage des agents antibiotiques.
- Développer des investissements durables pour combattre la résistance aux antibiotiques.

Au cours de ces dernières années, plusieurs stratégies alternatives pour lutter contre la résistance aux antibiotiques ont été proposées (Cotter et al., 2005; Cegelski et al., 2008; Alexandre et al., 2014; Ravat et al., 2015). L'une des alternatives qui suscite de plus en plus d'intérêt, est l'utilisation des bactériocines. Pour rappel, les bactériocines sont des peptides antimicrobiens (PAMs) produits par les bactéries. (Drider and Rebuffat, 2011). Les bactériocines produites par les bactéries lactiques (BLs), notamment par celles appartenant aux genres *Lactobacillus* ou *Lactococcus*, ont la particularité de posséder le statut GRAS (Generally Recognized As Safe). Elles sont généralement actives contre les espèces phylogénétiquement proches de la souche productrice et elles peuvent parfois être actives contre des pathogènes à Gram-positif tels que *Listeria monocytogenes*, *Clostridium*... (Drider et al., 2006).

En revanche, les bactéries à Gram-négatif sont généralement résistantes aux bactériocines produites par les BLs grâce à leur membrane externe qui les protège des macromolécules hydrophobes (Helander et al., 1997). Cependant, il existe quelques bactériocines comme les bactériocines ST28MS et ST26MS produites respectivement par les souches de *Lactobacillus plantarum* ST28MS et ST26MS, qui sont capables d'inhiber la croissance de certaines bactéries à Gram-positif (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) et à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Acinetobacter baumannii*) (Todorov and Dicks, 2005). Il en est de même pour la bactériocine OR-7 produite

par *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514 qui est active contre la bactérie à Gram-négatif *Campylobacter jejuni* (Stern et al., 2006).

Cette thèse a été réalisée au sein de l'UMRT INRAE BioEcoAgro 1158 (Université de Lille), Elle a pour objectifs de caractériser les bactériocines produites par *Lacticaseibacillus paracasei* CNCM I-5369, plus particulièrement la lacticaséicine 30 et comprendre son activité contre les bactéries à Gram-négatif.

Ce manuscrit comprend une première partie bibliographique exposant les différentes stratégies suggérées pour lutter contre l'antibiorésistance, y compris les bactériocines produites par les BLs, une revue bibliographique décrivant les principaux modes d'action et les mécanismes d'immunité des bactériocines produites par les BLs et leur potentiel d'application ainsi que leur expression en système natif et hétérologue.

La deuxième partie comporte l'ensemble des résultats obtenus dans le cadre du projet de cette thèse et présentés sous formes d'articles publiés ou en cours de publication. Ces résultats débutent par l'étude de l'expression des cinq bactériocines *L. paracasei* CNCM I-5369 en systèmes natif et hétérologue et leurs « partielles » caractérisations, ensuite viennent les résultats afférents à la relation entre la structure de la lacticaséicine 30 et son activité contre les bactéries à Gram-négatif, et enfin vient la partie afférente au développement d'une formulation basée sur la combinaison de la lacticaséicine 30 et la colistine, et l'évaluation de l'activité antibactérienne contre un panel de souches cliniques multirésistantes.

La dernière partie de ce manuscrit est consacrée à une discussion générale et la contextualisation du sujet de recherche. Cette thèse se termine par une conclusion ainsi que la suggestion et argumentation de différentes perspectives pour entrevoir la suite de ce projet dans un futur proche, c'est-à-dire à court-terme.

# **Etude Bibliographique**

Literature review

## **1. Quelles alternatives thérapeutiques à mettre en place pour lutter contre le phénomène d'antibiorésistance**

Comme évoqué, la problématique de l'antibiorésistance est une crise de santé publique, qu'il convient de considérer au plus haut point. En effet, les indicateurs épidémiologiques, mais surtout prévisionnels laissent à penser à une exacerbation de cette crise qui se traduira par un nombre de morts plus élevé, par des coûts économiques très élevés et même par un impact socio-économique majeur car de nombreuses personnes se retrouveront dans des difficultés sociales. Pour réduire l'impact de cette crise de l'antibiorésistance, il convient de jouer sur plusieurs leviers en limitant l'émergence et le développement des bactéries multirésistantes. Il est clair que la prescription et la consommation des antibiotiques doivent être mieux gérées tant en santé humaine, qu'en médecine vétérinaire. Même si des efforts sont faits dans ce sens, le chemin à parcourir reste long. D'autre part, il convient de mieux gérer le stock d'antibiotiques dont nous disposons actuellement, étant donné les faibles investissements de l'industrie pharmaceutique, en termes de recherches de nouveaux antibiotiques, ou de la modification des structures des antibiotiques existants. Des alternatives aux antibiotiques, pour entrer dans l'ère post-antibiotique, sont tout à fait souhaitables et possibles. Dans ce sens, plusieurs perspectives et mesures ont été évoquées et suggérées durant cette dernière décennie afin de contribuer à réduire les impacts négatifs de l'antibiorésistance sur nos sociétés.

### **1.1. La thérapie d'anti-virulence**

Comme précédemment indiqué, les antibiotiques agissent sur différents cibles et processus cellulaires tels que la biosynthèse de la paroi cellulaire, ou encore celle des protéines. Ils peuvent aussi agir sur la répllication de l'ADN, la transcription de l'ADN en ARN messager qui sont des mécanismes cruciaux pour la croissance et la survie bactérienne. Comprendre la virulence des bactéries multirésistantes par les outils de biologie moléculaire et par les techniques dites « omiques » est un objectif de recherche important, pouvant aider à mieux concevoir les molécules antibiotiques ou des approches ciblant ces facteurs de virulence. L'atténuation de l'expression des gènes impliqués dans la virulence/pathogénicité bactérienne est une stratégie innovante. Ces stratégies visent à perturber le cycle infectieux, en inhibant les processus d'adhésion, invasion, ou encore de neutralisation des défenses de l'hôte, la perturbation de la synthèse des toxines endo ou exotoxines (Cegelski et al., 2008). Contrairement aux antibiotiques à spectre large, la thérapie d'anti-virulence éviterait sans doute une altération du microbiote intestinal de l'hôte permettant aux bactéries symbiotiques de garder et exercer leurs fonctions vitales et bénéfiques pour l'organisme hôte.



### 1.1.1. Cible de l'attachement et de la colonisation microbienne

L'une des premières étapes d'une infection bactérienne est la colonisation de l'hôte. Les bactéries vont s'adhérer aux cellules de l'hôte par des protéines appelées « adhésines », chacune interagissant spécifiquement avec des récepteurs situés à la surface de la cellule hôte. Les bactéries pathogènes peuvent présenter de multiples adhésines pouvant se lier à différents sites spécifiques chez l'hôte à des moments particuliers au cours d'un cycle infectieux complexe (**Tableau 1**). En général, la plupart des adhésines sont intégrées dans des complexes de fibres extracellulaires hétéropolymériques appelées pili ou fimbriae (Hung and Hultgren, 1998). Les pili P, pili assurant l'adhérence d'*Escherichia coli*, sont impliqués dans l'infection des voies urinaires chez l'Homme par l'intermédiaire d'une adhésine appelée PapG (Voet and Voet, 2016). L'adhésine PapG, située à l'extrémité du bout flexible des Pili P, se lie spécifiquement aux groupements digalactoside  $\alpha$ -D-galactopyranosyl-(1 $\Rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranose (Hultgren et al., 1989). En revanche, l'adhésine FimH, généralement présente aux extrémités des pili de type I, se lie aux groupements mannoses du récepteur uroplakine 1a des cellules épithéliales urinaires (Sauer et al., 2016).

**Tableau 1.** Exemples d'adhésines associées à des maladies chez l'homme (Cegelski et al., 2008)

Adhésine	Fibres adhésive	Organismes	Maladies associées
<b>FimH</b>	Pili de Type 1	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> et espèces de <i>Salmonella</i>	Cystite
<b>PapG</b>	Pili P	<i>E. coli</i>	Cystite et pyélonéphrite
<b>PrsG</b>	Pili Prs	<i>E. coli</i>	Cystite
<b>SfaS</b>	Pili S	<i>E. coli</i>	Infection des voies urinaires et méningite du nouveau-né
<b>HifE</b>	Pili Hif	<i>Haemophilus influenzae</i>	Otite moyenne et méningite
<b>FimD</b>	Pili de type 2 et 3	<i>Bordetella pertussis</i>	Coqueluche

L'adhésion est un facteur de virulence important chez les bactéries pathogènes. La possibilité d'empêcher l'adhésion d'une bactérie pathogène représente une stratégie idéale pour lutter

contre les maladies infectieuses. L'une des options pouvant être envisagée, est d'inhiber la fonction médiée par les fibres adhésives (pili) (Cegelski et al., 2008):

- Soit en empêchant la liaison des bactéries pathogènes aux cellules hôtes.

Par exemple, les dérivés carbohydrates des ligands de l'hôte, tels que le 4-méthylumbelliferyl  $\alpha$ -mannoside et le p-nitro-o-chlorophényl  $\alpha$ -mannoside, se sont révélés efficaces pour bloquer les propriétés adhésives des pili de type 1 et P. Ils peuvent être employés comme agents thérapeutiques dans le but de prévenir l'adhérence *in vivo* des souches pathogènes exprimant des pili de type 1 (Firon et al., 1987).

- Soit en interrompant l'assemblage des pili, ce qui bloque également l'adhésion médiée par ces structures ainsi que la colonisation et la formation de biofilms intracellulaires.

Les pili de type 1 et P, les plus étudiés, sont assemblés par une famille de protéines appelées « chaperonne-usher ». Ces dernières années, afin de lutter contre la virulence des bactéries pathogènes, une nouvelle classe de molécules appelée « pilicide » a été développée pour inhiber la fonction de ces protéines. Les pilicides vont inhiber la biogénèse des pili et par la suite vont entraver l'invasion et la formation de biofilms intracellulaires (Aberg and Almqvist, 2007).

### 1.1.2. Altération ou destruction de la production de toxine

Certaines bactéries pathogènes ont la particularité de produire des toxines dangereuses (Tableau 2). Certaines toxines agissent à l'extérieur de la cellule en se liant à des récepteurs cellulaires ou en formant des pores dans la membrane, tandis que d'autres toxines sont capables d'induire la translocation d'un fragment catalytique dans le cytoplasme.

**Tableau 2.** Exemple de toxines bactériennes associées à des maladies chez l'Homme

Toxines	Organismes	Maladies associée
<b>Toxine cholérique</b>	<i>Vibrio cholerae</i>	Choléra
<b>Toxine pertussique</b>	<i>Bordetella pertussis</i>	Coqueluche
<b>Toxine diphtérique</b>	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Diphtérie
<b>Toxine tétanique</b>	<i>Clostridium tetani</i>	Tétanos
<b>Toxine botulinique</b>	<i>Clostridium botulinum</i>	Botulisme
<b>Shiga-toxine</b>	<i>E. coli</i> producteurs de Shiga-toxines (STEC)	Gastro-entérite

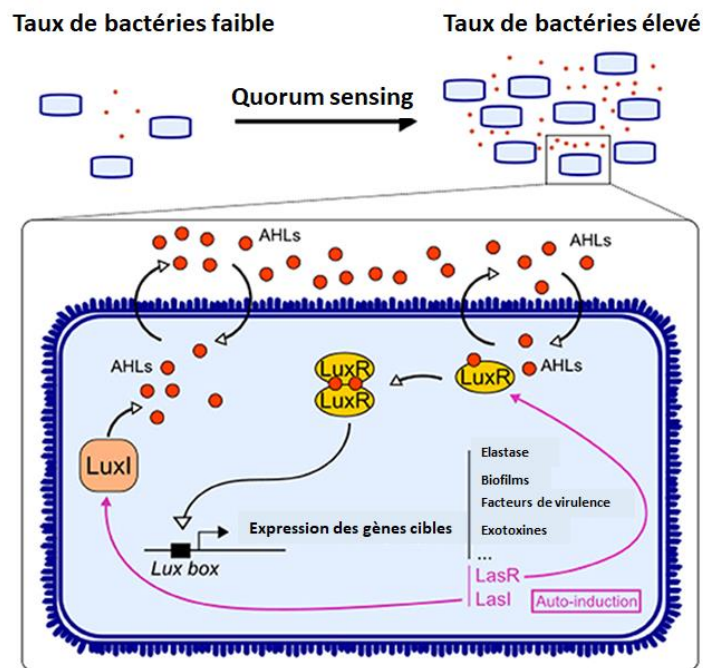
Altérer la production de toxine s'avère être une stratégie intéressante pour inhiber la virulence de ce type de bactéries. Dans cette optique, Hung et ses collaborateurs (2005) ont mis en

évidence une petite molécule, l'acide 4-[N-(1,8-naphtalimide)]-n-butyrique, appelée couramment la virstatine, qui inhibe la régulation de la virulence chez *Vibrio cholerae*. En effet, la virstatine inhibe le régulateur transcriptionnel ToxT (impliqué dans la transcription du gène de la toxine du choléra) et par la suite empêche l'expression de deux facteurs de virulence critiques de *V. cholerae*, qui sont la toxine cholérique et le pilus.

Une autre alternative qui peut être envisagée contre la production de toxines, est l'utilisation d'anticorps. Bien que leur utilisation dans le traitement des infections bactériennes ait été largement surpassée par celle des antibiotiques, les anticorps restent une alternative intéressante qui peut être envisagée pour traiter les maladies provoquées par la production de toxines telles que la diphtérie, le tétanos et le botulisme....

### **1.1.3. Perturbation de la régulation de l'expression des gènes de virulence**

Chez certaines bactéries, la régulation des facteurs de virulence se fait par « *quorum sensing* ». Ce mécanisme repose sur la communication entre les bactéries à travers des petites molécules de diffusion dans le but de coordonner leur comportement et leur adaptation vis-à-vis de leur environnement. Ainsi, lorsque la densité bactérienne augmente, la quantité de ces molécules croît jusqu'à atteindre un seuil déclenchant l'activation ou la répression de certains gènes chez l'ensemble des bactéries (Le Berre et al., 2006). Chez *Pseudomonas aeruginosa*, une bactérie pathogène provoquant des infections aiguës ou chroniques parfois graves et mortelles, les facteurs de virulence (système de sécrétion, des adhésines, capacité de former des biofilms...) sont régulés de manière hiérarchique et précise par le QS (**Fig. 4**). Différents types de molécules, tels que les acyl homosérine lactones (AHL), sont produites et détectées par différents systèmes de QS tels que LasR-LasI et RhlR-RhlI (**Fig. 4**). Ensuite, ces signaux se lient aux régulateurs de transcription et induisent l'expression des gènes de virulence et la formation du biofilm (Rasko and Sperandio, 2010).



**Figure 4.** Mécanisme de quorum sensing chez les bactéries (Coquant et al., 2020).

Plusieurs stratégies ont été développées pour inhiber les systèmes de QS qui sont impliqués dans l'expression des gènes de virulence des germes pathogènes. Elles consistent notamment à utiliser des molécules identifiées à l'aide d'un criblage à haut débit de bibliothèques de molécules chimiques, ou des antagonistes modélisés sur la base de la structure moléculaire du signal et/ou du récepteur. D'autres stratégies font appel à l'utilisation des enzymes qui dégradent le signal de QS appelées quorum quenching (Rasko and Sperandio, 2010). C'est le cas de *Bacillus spp*, qui exprime une molécule appelée lactonase, impliquée dans l'inhibition du mécanisme de QS chez *P. aeruginosa*. L'acyl-homosérine lactonase (AHL-lactonase) inactive l'activité des AHL en hydrolysant la liaison lactone des AHL. Des études réalisées sur des plantes transgéniques exprimant l'AHL-lactonase ont montré une résistance significativement accrue à une infection bactérienne dépendante du QS (Dong et al., 2001).

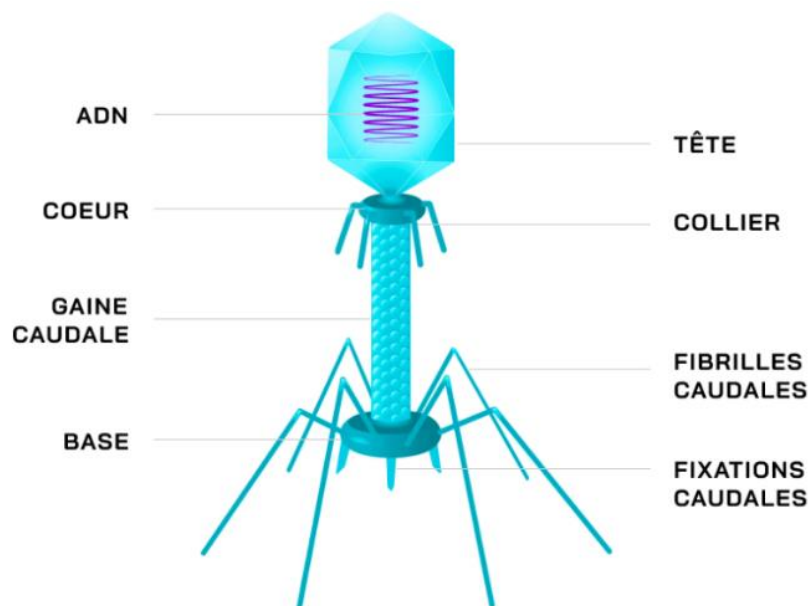
Les médicaments ciblant les systèmes de signalisation bactériens sont intéressants en raison de leur toxicité spécifique, étant donné que ces systèmes sont généralement absents chez les hôtes eucaryotes. La perturbation de la virulence bactérienne est une approche intéressante, car elle exerce une pression sélective moins importante sur le développement de la résistance bactérienne contrairement aux antibiotiques à spectre large, qui visent à tuer toutes les bactéries ou à empêcher leur croissance.

## 1.2. La thérapie phagique (phagothérapie)

Les bactériophages, appelés également phages, sont des virus qui n'infectent que les bactéries. Comme pour la plupart des virus, l'infection débute par la liaison du virion à des récepteurs spécifiques de la surface cellulaire, suivie d'une réplication intracellulaire. De par sa grande spécificité, un phage ne reconnaît qu'une espèce, voire une sous-espèce de bactérie (Chan et al., 2013). Présents dans l'ensemble de la biosphère, les phages constituent le groupe d'entités biologiques le plus abondant et le plus diversifié de la planète (Rohwer, 2003). Ils sont présents dans tous les écosystèmes, y compris dans les milieux les plus hostiles et contribuent à l'évolution génétique de nombreux micro-organismes en régulant la croissance des bactéries (Ravat et al., 2015).

### 1.2.1. Structure et mécanismes d'action des phages

De manière générale, un phage contient de l'acide nucléique (pouvant être de l'ADN ou de l'ARN), enfermé dans une capsid, constituée soit de protéines ou de lipoprotéines. La taille de leur génome est très variable pouvant aller de quelques milliers de paires de bases, à plus d'une centaine de milliers. Leurs morphologies peuvent varier d'une famille à une autre, ils peuvent être polyédriques, cubiques, filamenteux ou encore pléomorphes (**Fig. 5**). En général, les phages avec une capsid polyédrique possèdent en plus une queue qui leur permet de se fixer aux bactéries et de les infecter. Cette queue peut être contractile (famille des *Myoviridae*), longue et non-contractile (famille des *Siphoviridae*) ou courte et non-contractile (famille des *Podoviridae*) (Kutter and Sulakvelidze, 2004).



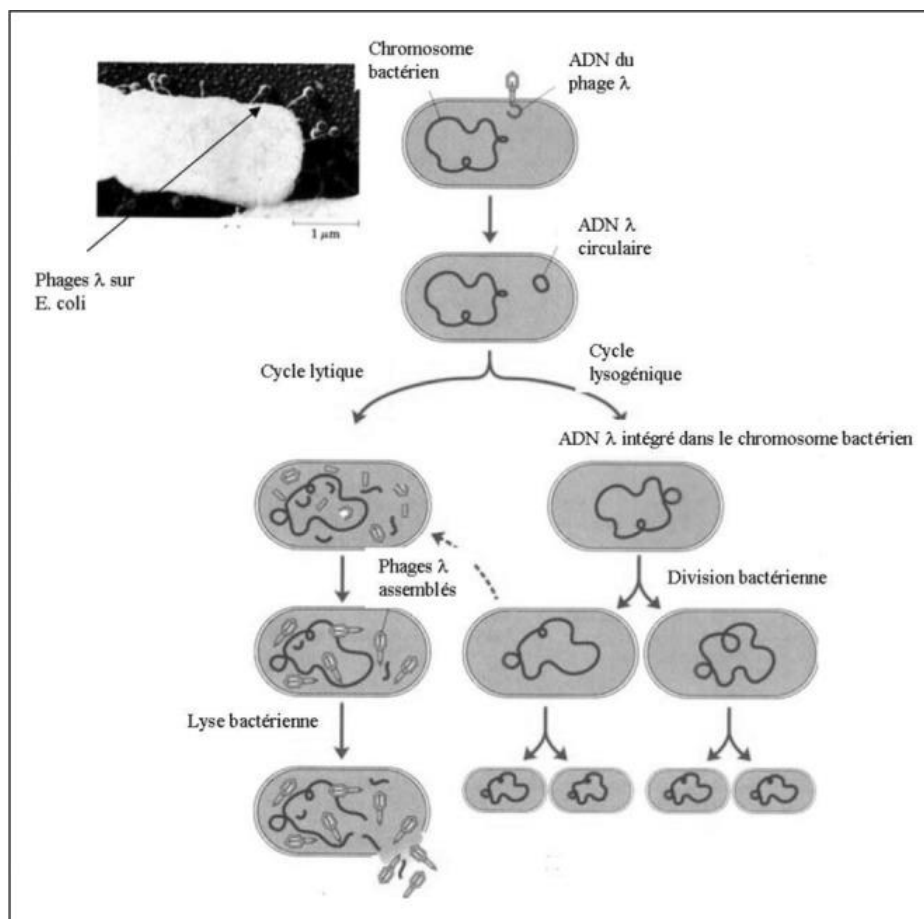
**Figure 5.** Schéma représentatif et simplifié d'un bactériophage ([www.pherecydes-pharma.com](http://www.pherecydes-pharma.com)).

Comme tous les virus, les phages sont des parasites intracellulaires, qui doivent infecter une bactérie pour pouvoir se multiplier. Selon leur cycle biologique, deux types de bactériophages peuvent être différenciés, les phages dits lytiques représentant ainsi la majorité des phages et les phages dits tempérés (Ravat et al., 2015).

Les phages lytiques ont la capacité de détruire les bactéries qu'ils infectent, après avoir détourné la machinerie bactérienne à leur profit pour se reproduire et se multiplier. Lors de la lyse de la bactérie, plusieurs dizaines de nouveaux phages identiques à l'original sont libérés dans le milieu extracellulaire et s'attaquent à d'autres bactéries de la même espèce. Le cycle lytique des phages comprend différentes étapes (**Fig. 6**) (Ravat et al., 2015):

- L'**arrimage**, correspondant à la fixation du phage sur la bactérie grâce à des récepteurs spécifiques au phage et à l'espèce bactérienne à laquelle il s'attaque.
- La **pénétration** suivie de l'**injection du matériel génétique**. Au cours de cette étape, une endolysine virale va percer un pore dans la membrane bactérienne et permet ainsi la pénétration de la queue du bactériophage dans le cytoplasme de la bactérie, afin d'y injecter son matériel génétique.
- La **réplication**. Dans cette étape, le génome viral va détourner le métabolisme bactérien à son profit. Une nucléase phagique va fragmenter le génome bactérien, dans le but de le rendre inutilisable et donc il n'y aura plus de multiplication bactérienne.
- **Maturation** et **assemblage** des différents éléments du phage.
- **Lyse bactérienne** permettant la libération des phages nouvellement formés dans le milieu extracellulaire.

Seuls les phages lytiques présentent un intérêt pour la phagothérapie car ils entraînent la mort des bactéries cibles qui leur sont spécifiques.



**Figure 6.** Les deux types de bactériophages (lytiques, tempérés) et leurs cycles associés (lytique et lysogénique) (Ravat et al., 2015).

Les phages tempérés ont la particularité d'intégrer leur génome au chromosome bactérien, via un mécanisme appelé transduction. Durant leur cycle phagique, appelé cycle lysogénique, les phages tempérés peuvent conférer de nouvelles propriétés à la bactérie hôte, telles que des gènes de virulence, gène de résistance à un antibiotique.... Ils peuvent rester quiescents pendant très longtemps avant d'entamer leur reproduction et d'entrer dans un cycle lytique (**Fig. 6**). Contrairement aux phages lytiques, les phages tempérés ne peuvent pas être utilisés comme un outil thérapeutique (Ravat et al., 2015).

### 1.2.2. Potentiel thérapeutique des phages

Découverts en 1917 par Francis d'Herelle, chercheur ayant travaillé à l'Institut Pasteur de Paris, les bactériophages ont suscité peu d'intérêt pour la communauté médicale moderne, d'autant plus avec le développement et l'usage des antibiotiques, qui furent rapidement érigés en traitement de choix dans la médecine occidentale (Dublanche et Bourne, 2007). Seuls les pays de l'ancienne Union Soviétique, n'ayant pas accès aux antibiotiques, avaient continué d'utiliser les bactériophages pour traiter les maladies infectieuses d'origine bactérienne chez les

soldats (fièvre typhoïde, dysenterie bacillaire, staphylococcies, streptococcies, gangrène gazeuse...). Cependant les résultats de ces essais cliniques ont été très peu publiés dans la littérature scientifique, à cause de la guerre froide qui ne permettait pas la communication scientifique entre les blocs de l'Est et de l'Ouest, d'autant plus que cette approche était déconsidérée chez les spécialistes et les autorités sanitaires du bloc de l'Ouest (Sulakvelidze et al., 2001). Après l'effondrement de l'Union Soviétique, certains centres comme celui de Tbilissi en Géorgie (Phage Therapy Center), le plus connu, et également celui de Wroclaw en Pologne (Institut d'immunologie et de thérapie expérimentale) ont toutefois continué à se spécialiser en phagothérapie.

Aujourd'hui, avec l'émergence des bactéries multirésistantes, la phagothérapie est de nouveau envisagée comme une approche alternative dans la lutte contre les infections. En plus des centres de recherches cités précédemment, plusieurs startups spécialisées dans la phagothérapie ont vu le jour ces dernières années. En effet, des traitements antibactériens basés sur l'utilisation de phages ont été développés afin de lutter contre les infections bactériennes chez l'Homme, notamment celles qui sont causées par les souches *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *E. coli* qui ont été reconnus par l'OMS comme les agents causant les infections les plus dangereuses (<https://www.who.int/>). Certains phages ont déjà été administrés dans le cadre de traitements compassionnels en France sous la supervision des autorités sanitaires françaises. Des patients atteints d'une infection récidivante du genou prothétique à *S. aureus*, pour laquelle l'explantation n'était pas envisageable, ont été traités par des phages au cours d'une intervention chirurgicale dite DAIR (Debridement Antibiotics Implant Retention) suivie d'une thérapie antimicrobienne suppressive (Ferry et al., 2020). Les phages peuvent être aussi utilisés en agriculture pour lutter contre les pathogènes des plantes tels que *Pseudomonas syringae* et *Xanthomonas campestris*. Il existe aussi des préparations de phages qui peuvent être utilisées en bioconservation pour lutter contre la croissance de *Listeria monocytogenes* dans les aliments, et validé par l'Organisation pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) aux USA (LISTEX P100).

Bien évidemment, la phagothérapie compte de nombreuses limites qui pourraient entraver son développement (Ravat et al., 2015). Il est difficile de trouver des phages contre certaines bactéries cibles et leurs applications ne peuvent se faire qu'en contact direct avec la bactérie, car chez l'homme l'injection de phages paraît vouée à l'échec puisque ceux-ci seront en principe détruits par le système immunitaire (Ravat et al., 2015). Il en est de même pour les infections produites par des bactéries intracellulaires, bactéries dont le développement dépend de leur cellule-hôte pour l'accès aux nutriments (tuberculose, légionellose par...).



Actuellement, il n'existe pas de cadre réglementaire quant à l'usage de la phagothérapie, car les phages ne sont pas considérés comme des médicaments, ni des organes, ni des vaccins, ni des dispositifs médicaux. Ils sont juste considérés comme des préparations magistrales, ce qui rend difficile leur emploi dans un cadre réglementaire (Aminov et al., 2017).

### 1.3. Utilisation des probiotiques

L'une des stratégies alternatives qui a été proposée pour lutter contre la résistance aux antibiotiques est l'usage des probiotiques. Au cours de ces dernières années, plusieurs définitions du terme probiotiques ont été proposées. Aujourd'hui, la définition qui est communément acceptée par l'ensemble de la communauté scientifique est celle de l'OMS, selon laquelle, « les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte, au-delà des effets nutritionnels traditionnels ». Bien que les probiotiques appartenant au groupe des BLs, plus particulièrement aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, soient les plus étudiés, d'autres bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif ainsi que des levures, ont été reconnues comme étant des probiotiques (**Tableau 3**) (Millette, 2007). Aujourd'hui, pour qu'un micro-organisme soit considéré comme un probiotique, celui-ci doit remplir plusieurs critères, parmi lesquels :

- La démonstration de l'identité et origine, celles-ci doivent être établies
- Une innocuité démontrée
- Une viabilité au site d'action
- Des effets bénéfiques avérés

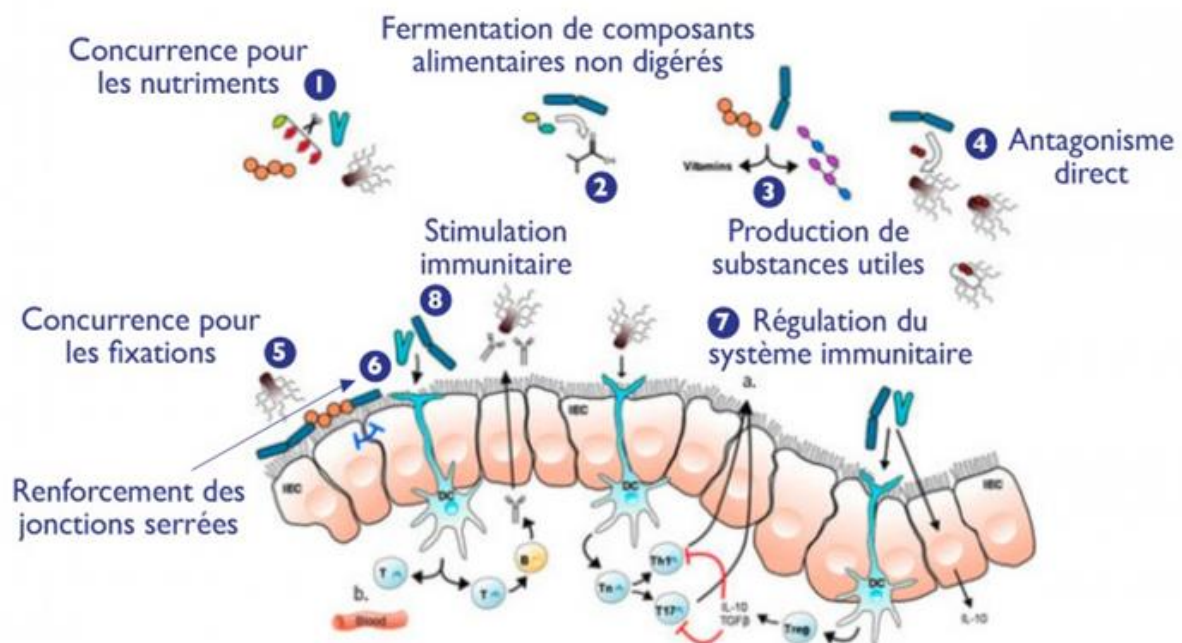
**Tableau 3.** Exemple de formulations de probiotiques commercialisées (Kaur et al., 2002)

Nom du produit	Bactéries probiotiques présentes
Kyo-Dophilus® capsules (Wakunaga Probiotics)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium longum</i>
TH1 Probiotics™ (Jarrow Formulas)	<i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Saccharomyces boulardi</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>
Subalin	Probiotique recombinant ( <i>Bacillus subtilis</i> )
Colinfant, Mutaflor®	Non entéro-pathogène <i>Escherichia coli</i>

Les bénéfices possibles liés à l'usage des probiotiques sont divers et comprennent des effets immunomodulateurs, la prévention de la diarrhée et des effets anticancéreux... (Prescott et al., 2018).

Les probiotiques sont considérés actuellement comme une option thérapeutique attractive, du fait de l'évolution de l'incidence des résistances aux antibiotiques, qui ne cesse de croître parmi les pathogènes. Selon Alexandre et al. (2014), les effets protecteurs des probiotiques contre les bactéries pathogènes reposent sur trois processus biologiques (**Fig. 7**) :

- Modulation du système immunitaire, en stimulant les défenses immunitaires innées (phagocytose, cytokines pro-inflammatoires), et en agissant favorablement sur la durée d'une infection ;
- Renforcement de la fonction barrière de l'épithélium, en inhibant par exemple l'adhésion de certaines souches pathogènes à une catégorie de lignée cellulaire ;
- Activité antimicrobienne directe ;



**Figure 7.** Principaux mécanismes d'action des probiotiques d'après O'Toole et Cooney (2008).

L'activité antimicrobienne des souches probiotiques est due en grande partie à la production de composés antimicrobiens tels que les PAMs (y compris les bactériocines), le peroxyde d'hydrogène, les acides organiques... (Oelschlaeger, 2010).

## 1.4. Les peptides antimicrobiens

Les PAMs sont des protéines de faible masse moléculaire et dont beaucoup sont chargés positivement. Ces molécules produites par toutes les formes de vie, allant des micro-organismes aux êtres humains, éliminent les bactéries par divers mécanismes (Mahlapuu et al., 2016).

À ce jour (21/10/2021), 3,273 peptides antimicrobiens, appartenant aux six règnes répertoriés, ont été recensés dans la base de données des peptides antimicrobiens de référence de l'université du Nebraska aux USA (<https://aps.unmc.edu/>)(Tableau 4).

**Tableau 4.** Nombre de peptide antimicrobien en fonction des règnes.

Règne	Nombre de peptide antimicrobien
Animaux (y compris les peptides synthétiques)	2424
Plantes	361
Champignons	22
Protistes	8
Archées	5
Bactéries	369

## 2. Les bactériocines

Le terme "bactériocine" a été inventé à l'origine pour décrire les peptides antimicrobiens produits par *Escherichia coli*, y compris la colicine, qui fut la première bactériocine découverte en 1925 par le professeur André Gratia. Aujourd'hui, ce terme est utilisé pour définir un groupe beaucoup plus large des peptides antimicrobiens non cytotoxiques, synthétisés par voie ribosomale. Ces peptides sont produits à la fois par des bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif (Riley and Wertz, 2002).

Les bactériocines constituent un groupe très hétérogène de peptides antimicrobiens. Elles diffèrent par leur masse moléculaire, leur spectre d'action, leur mode d'action, leur mécanisme de biosynthèse et de sécrétion et leur mécanisme d'autoprotection (Salazar et al., 2017). Elles sont capables de tuer des micro-organismes phylogénétiquement proches de la souche productrice, alors on parle de spectre étroit, ou un large éventail de micro-organismes, alors on parle de spectre large (O'Connor et al., 2020). Les bactériocines ont la capacité de médier la compétition entre différentes espèces bactériennes d'une même niche écologique (Rezaei Javan et al., 2018).

## 2.1. Les bactériocines produites par les bactéries à Gram-négatif

Plusieurs bactériocines produites par les bactéries à Gram-négatif ont déjà été identifiées. Elles peuvent être classées en deux groupes en fonction de leur taille, leur structure et leur mode d'action (Gordon et al., 2007).

### 2.1.1. Les microcines

Les microcines sont des bactériocines de faible masse moléculaire (inférieure à 10 kDa), produites principalement par les entérobactéries (en particulier par les souches d'*E. coli*). Elles possèdent une résistance aux protéases, aux pH extrêmes et aux températures élevées (Baquero et al., 2019). Généralement de nature hydrophobe, elles forment une classe de bactériocines très restreinte mais hétérogène, avec une dizaine de représentants identifiés à ce jour (Rebuffat, 2012).

La biosynthèse des microcines implique un cluster de gènes organisés en un seul ou plusieurs opérons, composé de gènes codant le précurseur de la microcine, des gènes codant les protéines impliquées dans les mécanismes d'immunité, des gènes codant les protéines responsables de la sécrétion de la microcine et les gènes codant les enzymes responsables des modifications post-traductionnelles (Duquesne et al., 2007b).

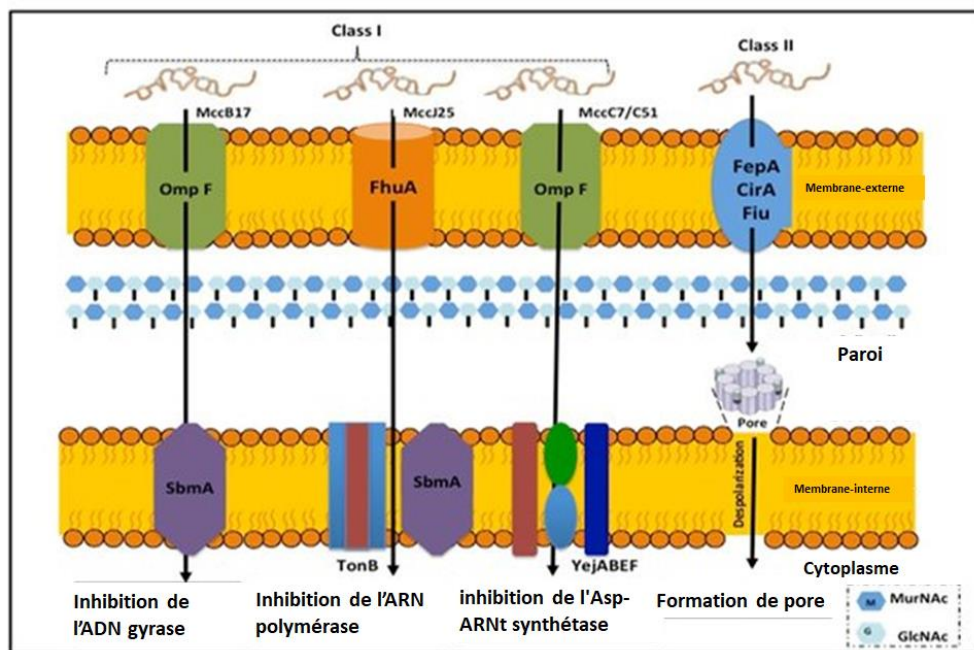
Comme bon nombre de bactériocines, les microcines sont synthétisées sous forme de peptide-précurseur, correspondant à la partie structurale de la bactériocine (core-peptide) rattachée à un peptide leader. Le peptide-précurseur est mûri pendant sa sécrétion au cours de laquelle le peptide leader est clivé. Pour se protéger contre leurs propres bactériocines, les souches productrices vont exprimer simultanément des protéines impliquées dans les mécanismes d'immunité contre leurs propres microcines (Duquesne et al., 2007a).

Selon leur masse moléculaire et leurs caractéristiques structurales (présences de ponts disulfures, modifications post-traductionnelles...), les microcines peuvent être divisées en deux grandes classes (Duquesne et al., 2007b):

- **La classe I** contient les microcines dont la masse moléculaire est inférieure à 5 kDa et qui subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles avant d'être actives (MccB17, MccC et MccJ25). Les gènes impliqués dans la biosynthèse des microcines de classe I sont portés par un plasmide.
- En revanche, les microcines appartenant à la **classe II** ont une masse moléculaire comprise entre 5 et 10 kDa et peuvent être subdivisées en deux sous-classes :

- **La classe IIa** rassemble les microcines codées par un plasmide, qui ne sont pas soumises à des modifications post-traductionnelles mais peuvent quand même comporter un voire deux ponts disulfures (MccL, MccV et MccN).
- Les microcines de **classe IIb**, dont le gène est présent dans le chromosome bactérien, sont linéaires et peuvent subir une modification post-traductionnelle au niveau C-terminal (MccE492, MccM et MccH47).

Généralement les microcines sont actives contre des bactéries étroitement liées aux souches productrices. Bien qu'il existe très peu d'homologie structurale entre les différentes microcines identifiées, elles utilisent la même stratégie appelée « cheval de Troie » pour tuer leurs cibles. En effet, soit elles miment un nutriment essentiel, par exemple un complexe sidérophore de fer, permettant leur reconnaissance par des récepteurs spécialisés de la membrane externe et leur translocation ultérieure dans l'espace périplasmique de leurs cibles. Ou alors, elles sont sécrétées sous forme de molécules inoffensives et se transforment dans les bactéries cibles en molécules toxiques (**Fig. 8**) (Rebuffat, 2012).



**Figure 8.** Exemples de mécanismes d'actions des microcines en fonctions de leurs classes (Alvarez et al., 2017).

Par exemple, la microcine E492 produite par *Klebsiella pneumoniae*, subit une modification post-traductionnelle se traduisant par l'attachement à son extrémité C-terminale de dérivés glycosylés de l'entérochéline (salmochéline), un sidérophore largement utilisé par les *Enterobacteriaceae*. Ce composé est crucial pour l'activité antibactérienne, car il permet la

reconnaissance de la toxine et son transfert dans le périplasma par les récepteurs de catécholate ferrique situés dans la membrane externe des cellules cibles. Une fois dans l'espace périplasmique, la microcine E492 interagit avec la mannose perméase, induit à la fois une formation de pores et une dépolarisation de la membrane interne, entraînant la mort cellulaire (Marcoleta et al., 2018).

Un autre exemple, la microcine J25, modèle d'étude des lasso-peptides, présente un cycle macrolactame fermé entre l'extrémité N-terminale et la chaîne latérale de l'acide glutamique en position 8, à travers lequel la région C-terminale est enfilée et piégée, formant une structure très originale dite en lasso. Ce cycle macrolactame est reconnu par un récepteur de ferrochrome (FhuA), permettant l'introduction de la microcine dans les cellules cibles. Une fois dans les cellules cibles, la microcine J25 va inhiber au moins deux cibles intracellulaires, le canal secondaire de l'ARN polymérase, entraînant une altération de la transcription, et les cytochromes bd-I et bo3, entraînant une inhibition de la respiration cellulaire (Mathavan and Beis, 2012; Shang et al., 2021).

En revanche, la microcine C, la plus petite microcine décrite à ce jour, pénètre dans les cellules cibles via la porine OmpF de la membrane externe et est transférée à travers la membrane interne à l'aide d'un transporteur de type ABC (ATP-Binding Cassette). Une fois à l'intérieur de sa cible, la microcine C contenant un adénosine monophosphate modifié attaché de manière covalente à l'aspartate de la région C-terminale, va cibler la traduction. En effet, elle est clivée dans la bactérie cible pour générer une entité toxique qui inhibe l'aspartyl ARNt synthétase. (Metlitskaya et al., 2006; Baquero et al., 2019).

### **2.1.2. Les colicines**

Les colicines sont des bactériocines, produites par des souches d'*E. coli*, qui présentent une activité contre des espèces proches de la souche productrice. D'autres bactériocines de type colicine sont produites par d'autres espèces de bactéries à Gram-négatif (Gordon et al., 2007). Par exemple, certaines souches de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Salmonella* produisent des bactériocines appelées pyocin-S (pour *Pseudomonas aeruginosa*) et salmocin (pour *Salmonella*) présentant les mêmes caractéristiques structurales que les colicines (Michel-Briand and Baysse, 2002; Schneider et al., 2018). Contrairement aux microcines, les colicines et les bactériocines de type-colicine sont des bactériocines avec des masses moléculaires très élevées allant de 40 à 80 kDa (Cascales et al., 2007). Leurs modes d'action reposent sur leurs interactions avec un récepteur de la membrane externe de la bactérie cible, suivi de leur translocation à l'intérieur de la cellule cible où elles peuvent exercer leur action létale. Selon le

système de translocation emprunté (Tol ou TonB), les colicines peuvent être classées en deux groupes. Le groupe A comprend les colicines qui sont transloquées par le système Tol, telles que les colicines A, E1 à E9, K, L, N, S4, U et Y, tandis que le groupe B comprend les colicines qui utilisent le système TonB, telles que les colicines B, D, H, Ia, Ib, M, 5 et 10 (Bouveret et al., 2002).

Les gènes impliqués dans la biosynthèse des colicines sont portés par un plasmide colicinogénique et sont organisés en structure opéronique. L'opéron colicine est constitué du gène structural de la colicine, d'un gène codant une protéine d'immunité et d'un gène codant une protéine de lyse permettant de libérer les colicines produites dans le milieu extérieur. L'ensemble des gènes constituant l'opéron colicine sont régulés par le promoteur SOS, qui n'est induit qu'en période de stress. En revanche la protéine d'immunité est sous le contrôle d'un promoteur constitutif qui le maintient en permanence à un niveau basal d'expression afin de protéger la cellule productrice (Gordon et al., 2007). Les plasmides colicinogéniques peuvent être divisés en deux classes en fonction de leurs tailles (Lehrbach and Broda, 1984):

- Les **plasmides de type I** ont une taille allant de 6 à 10 kb et sont présents en plusieurs copies par cellule. Ils codent les colicines appartenant au groupe A.
- Les **plasmides de type II** ont une taille d'environ 40 kb et sont présents en une seule copie par cellule. Ils sont capables de se conjuguer en permettant le transfert horizontal de gènes. Ils codent les colicines appartenant au groupe B.

La synthèse de l'ensemble des colicines appartenant au groupe A ainsi que la colicine D appartenant au groupe B, est un processus létal pour les cellules productrices, car la protéine de lyse est coexprimée avec la colicine. En revanche, le mécanisme de libération des colicines appartenant au groupe B exceptée la colicine D, reste encore inconnu. Néanmoins, aucune protéine de lyse n'a été identifiée suggérant ainsi que le mécanisme n'est pas létal pour la cellule productrice (Cascales et al., 2007).

La colicine est organisée en trois domaines fonctionnels (Cascales et al., 2007):

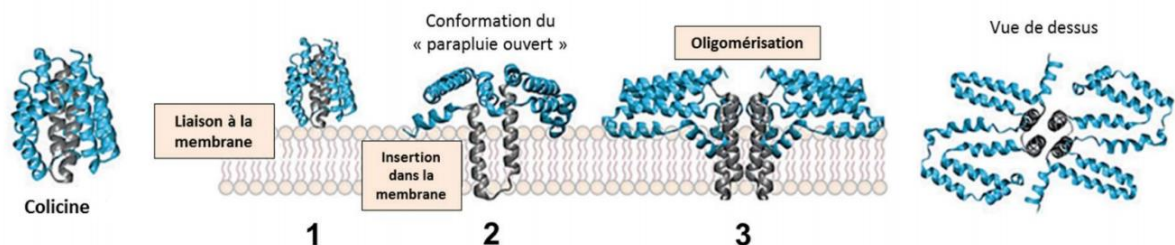
- Le domaine central, qui est impliqué dans la liaison de la colicine avec le récepteur membranaire de la cellule cible.
- Le domaine N-terminal, qui est impliqué dans la translocation de la colicine du milieu extracellulaire au milieu intracellulaire, en interagissant avec les protéines Tol (pour les colicines appartenant au groupe A) et TonB (pour les colicines appartenant au groupe B).



- Le domaine C-terminal, qui est responsable de l'activité cytotoxique de la colicine, soit par une activité nucléasique ou alors par une activité ionophorique (à travers la formation de pores).

Comme indiqué précédemment, la colicine peut présenter différents modes d'action en fonction de la structure de son domaine catalytique situé dans la région C-terminale.

Le domaine catalytique peut être impliqué dans la formation de pores en deux étapes. C'est le cas notamment pour les colicines A, E1, N, Ia et Ib. La première étape qui est voltage-dépendante, correspond à l'association du domaine catalytique de la colicine avec la membrane interne de la cellule cible. Plusieurs modèles ont été proposés pour décrire l'organisation structurale de la colicine au niveau de la membrane (Padmavathi and Steinhoff, 2008; Peraro and van der Goot, 2016). L'un des plus récents est celui proposé par Peraro et van der Goot, (2016), qui suggèrent une dimérisation de la colicine permettant la formation d'un pore suffisamment large pour favoriser le passage de certains ions. La deuxième étape qui est aussi voltage dépendante correspond à l'ouverture du pore, qui est associé au transfert d'une partie du domaine catalytique dans le cytoplasme. La formation de pores au niveau de la membrane interne entraîne une dépolarisation de la membrane et la fuite de petites molécules, conduisant à la mort cellulaire (**Fig. 9**) (Cascales et al., 2007).



**Figure 9.** Modèle putatif de formation de pores par la colicine. Le domaine C-terminal se lie dans un premier temps à la membrane (1). L'insertion du cœur hydrophobe au sein de la membrane s'accompagne d'un changement conformationnel, et le domaine catalytique adopte alors une conformation en « parapluie ouvert » (2). Une fois insérés, les domaines catalytiques vont se dimériser afin de permettre la formation de pores dans la membrane (3) (Peraro and van der Goot, 2016).

Toutes les colicines, exceptée la colicine M, présentent un domaine catalytique ayant une activité nucléasique. Elles vont cibler les acides nucléiques et les dégrader en hydrolysant les liaisons phosphodiester (Papadakos et al., 2012) :

- Les colicines E2, E7, E8 et E9 dégradent l'ADN chromosomique en le coupant de manière non spécifique. Elles peuvent aussi dégrader l'ADN simple brin et l'ARN.



- Les colicines E3, E4 et E6 ciblent l'ARN ribosomique 16S. Par exemple, la colicine E3 clive la liaison entre les nucléotides A-1493 et G-1494 au niveau du site A du ribosome, ce qui empêche la formation des liaisons peptidiques et affecte également la fixation des ARNt chargés au niveau du site A. Ces colicines sont responsables d'un arrêt de la synthèse protéique.
- Les colicines D et E5 sont responsables de la dégradation des ARNt, conduisant également à l'arrêt de la synthèse protéique.

## 2.2. Les bactériocines produites par les bactéries à Gram-positif

De nombreuses bactériocines produites par les bactéries à Gram-positif ont pu être identifiées grâce au développement des outils de bio-informatique tels Bagel4 (<http://bagel4.molgenrug.nl/>) et antiSMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org/>) (Acedo et al., 2018; Marques-Bastos et al., 2020). Les bactériocines produites par les bactéries à Gram-positif, le sont majoritairement par les BLs, en particulier par les genres *Lactobacillus*, *Lacticaseibacillus* et *Lactococcus* qui bénéficient du statut GRAS attribué par la FDA (Drider et al., 2006; Rea et al., 2011; Acedo et al., 2018).

Au cours de ces dernières années, plusieurs classifications des bactériocines produites par les BLs ont été proposées (Klaenhammer, 1993; Heng and Tagg, 2006; Alvarez-Sieiro et al., 2016; Dicks et al., 2018; Soltani et al., 2021). Cependant, nous retiendrons la classification qui a été proposée par Alvarez-Sieiro et *al.* (2016), qui comprend trois grandes classes :

- **La classe I** regroupe les peptides thermostables de faible masse moléculaire ( $\leq 10$  kDa), ayant subi une ou des modification(s) enzymatique(s) post-traductionnelles au cours de leurs processus de biosynthèse.
- **La classe II** regroupe les bactériocines thermostables, non modifiées, ayant une faible masse moléculaire ( $\leq 10$  kDa).
- **La classe III** contient les bactériocines thermolabiles, non modifiées et possédant une masse moléculaire élevée ( $\geq 10$  kDa).

### **3. Classification des bactériocines produites par les bactéries lactiques**

#### **3.1. Classe I, les peptides synthétisés par voie ribosomale et ayant subi une modification post-traductionnelle (RiPPs)**

Les RiPPs appartiennent à un groupe de peptides antimicrobiens connus pour leurs modifications enzymatiques post-traductionnelles au cours de leur processus de biosynthèse. Ces modifications post-traductionnelles vont entraîner la formation d'acides aminés et de structures inhabituelles (lanthionine, hétérocycles, cyclisation tête-queue, glycosylation...), qui vont par la suite jouer un rôle majeur dans l'activité antimicrobienne de ces peptides (Alvarez-Sieiro et al., 2016). Comme la plupart des bactériocines, les RiPPs possèdent un peptide ou une séquence leader attachée à leur extrémité N-terminale (Arnison et al., 2013). Parfois, dans de très rare cas, cette séquence leader peut être située à l'extrémité C-terminale de la bactériocine. C'est le cas de la bottromycine, produite par *Streptomyces bottropensis* DSM 40262, qui est une bactériocine présentant une activité contre les *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) et les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) (Gomez-Escribano et al., 2012). Ce n'est qu'après l'élimination de la séquence leader (pendant ou après la maturation) que le peptide devient actif (Oman and van der Donk, 2010). Les RiPPS sont produits à la fois par des bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif et sont regroupés en fonction de leurs modifications post-traductionnelles (Li and Rebuffat, 2020).

##### **3.1.1. Les lantibiotiques**

Les lantibiotiques contiennent des acides aminés déshydratés inhabituels tels que les acides aminés thioéthers (lanthionine (Lan) et/ou  $\beta$ -méthylanthionine (MeLan)) et d'autres acides aminés modifiés tels que les acides aminés  $\alpha,\beta$ -insaturés, 2, 3-didéhydroalanine (Dha) et 2,3-didéhydrobutyrine (Dhb) résultant de la déshydratation des acides aminés sérine et thréonine (McAuliffe et al., 2001). En effet, la déshydratation de la sérine en Dha et de la thréonine en Dhb donnent des acides aminés modifiés avec des centres électrophiles pouvant réagir avec des groupes nucléophiles proches. Le thioéther Lan est formé lorsque la double liaison de Dha est attaquée par le groupe thiol d'un résidu de cystéine voisin, tandis que le MeLan est formé lorsque le partenaire réactionnel est Dhb (McAuliffe et al., 2001). Les lantibiotiques sont des structures polycycliques contenant un certain nombre de cycles Lan et MeLan, jouant un rôle important dans la rigidité du peptide, sa résistance à la dégradation protéolytique et au traitement thermique (Willey and van der Donk, 2007).

Les lantibiotiques sont divisés en deux classes (type A et type B) en fonction de leurs caractéristiques structurelles et fonctionnelles (Daly et al., 2012). Les lantibiotiques de type A sont des peptides cationiques et linéaires (nisine, épidermine, subtiline...). Ils agissent sur la membrane de leurs cibles en formant des pores entraînant la fuite de petites molécules (Wilson-Stanford and Smith, 2011). Les lantibiotiques de type B sont des peptides globulaires (duramycine, mersacidine, actagardine...). Ils inhibent la synthèse de la paroi cellulaire de leurs cibles en perturbant la fonction enzymatique des lysozymes ou endo- $\beta$ -N-acétylmuramidases impliqués dans la liaison  $\beta(1-4)$  glycosidique entre les résidus MurNAc et GlcNAc du peptidoglycane pendant l'étape de transglycosylation (Sahl et al., 1995; Brötz et al., 1997).

Le cluster de gènes impliqué dans la biosynthèse des lantibiotiques est porté soit par un plasmide ou par le chromosome bactérien. Il est constitué de plusieurs gènes, comprenant le gène codant pour le peptide précurseur (LanA), une protéine d'immunité (LanI, LanFEG), un transporteur ABC (ATP-binding cassette) dédié (LanT), et des enzymes impliquées dans les modifications post-traductionnelles (LanM, LanB,C) (Chatterjee et al., 2005; Cheigh and Pyun, 2005; Bierbaum and Sahl, 2009). Selon les enzymes impliquées dans leur modification post-traductionnelle, les lantibiotiques de type A peuvent être subdivisés en deux groupes (McAuliffe et al., 2001):

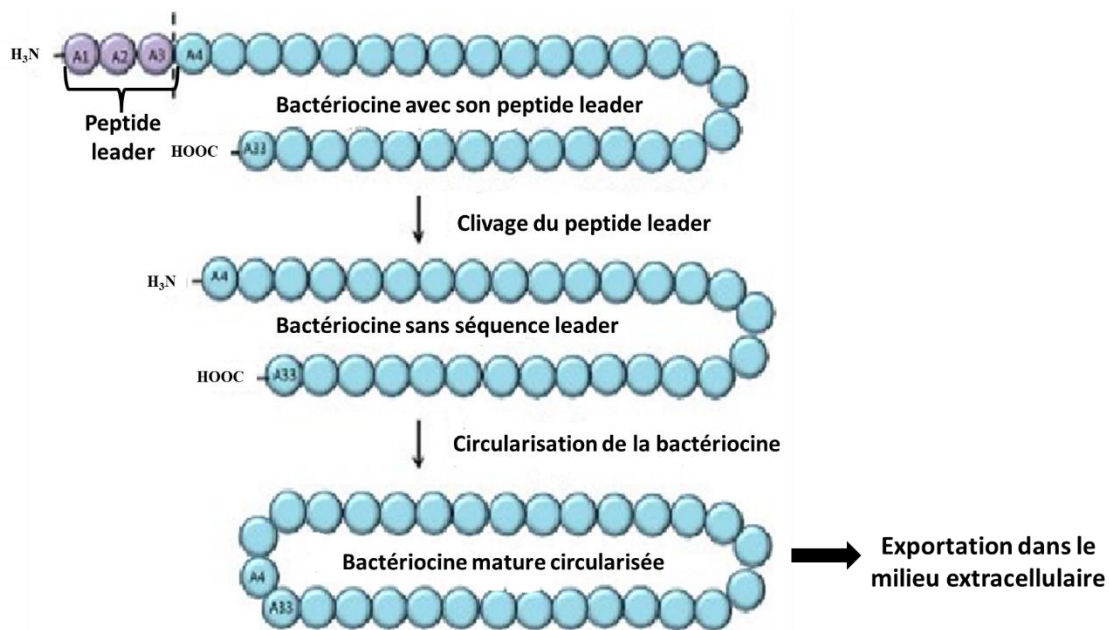
- Les lantibiotiques de type A-I (nisine, épidermine, subtiline et Pep5) sont modifiés par les enzymes LanB et LanC ;
- Les lantibiotiques de type A-II (lacticine 481, lactocine S, cytolysine et mersacidine) sont modifiés par l'enzyme LanM ;

### **3.1.2. Les bactériocines circulaires**

Les bactériocines circulaires sont des peptides dont les extrémités N-terminale et C-terminale sont reliées par une liaison peptidique suite à une modification post-traductionnelle. Leurs structures leur permettent de résister aux variations de température et de pH et leur assurent une protection contre de nombreuses protéases. Le terme "circulaire" a été adopté pour éviter toute confusion avec les peptides cycliques également produits par les microorganismes via de nombreuses étapes enzymatiques (Craik, 2004). Les bactériocines circulaires sont divisées en deux groupes en fonction de leurs homologies de séquence et de leurs caractéristiques physico-chimiques. **Le groupe I** contient des bactériocines circulaires cationiques avec un point isoélectrique élevé, tandis que **le groupe II** contient des bactériocines circulaires hautement

hydrophobes avec de nombreux résidus acides et un point isoélectriques bas (van Belkum et al., 2011). A ce jour, près d'une vingtaine de bactériocines circulaires ont été caractérisées, ce nombre devrait être appelé à augmenter car plusieurs nouvelles séquences codant pour des bactériocines circulaires ont été récemment identifiées (Vezina et al., 2020).

La biosynthèse des bactériocines circulaires comprend trois étapes, dont le clivage du peptide leader, la circularisation de la molécule et enfin son transport vers le milieu extracellulaire (**Fig. 10**).



**Figure 10** : Biosynthèse des bactériocines circulaires (Gabrielsen et al., 2014).

Il a été démontré que le clivage de la séquence leader est crucial pour déclencher les autres étapes (Gabrielsen et al., 2014). En effet, des études de mutagenèse dirigée réalisées sur la pré-bactériocine entéroccine AS-48 produite par *Enterococcus faecalis* AS-48 ont révélé que le résidu histidine-1 était impliqué dans la reconnaissance du site de clivage, car sa substitution par une isoleucine perturbait la production de la bactériocine dans le surnageant de culture cellulaire (Cebrián et al., 2010). Toujours dans la même optique, Cebrián et al. (2010) ont démontré que la substitution de la méthionine par l'alanine en position 1 de l'entéroccine AS-48 diminuait significativement l'efficacité de la circularisation. De même, la substitution du tryptophane en C-terminal par l'alanine empêcherait également la circularisation de la bactériocine, confirmant ainsi que les résidus N- et C-terminaux sont cruciaux pour le processus de circularisation.

Cependant, l'analyse *in silico* des clusters de gènes de bactériocines circulaires n'a montré aucun gène de peptidase et/ou de protéase qui pourrait être impliqué dans le clivage du peptide leader, suggérant que la réaction de clivage est réalisée par une ou plusieurs peptidases n'appartenant pas aux clusters de gènes de biosynthèse (Gabrielsen et al., 2014). Néanmoins, Gabrielsen et al. (2014) ont montré que le gène *garX* codant une grande protéine transmembranaire et les gènes *garBCDE* codant une protéine immunitaire putative suivie d'une ATPase et de deux protéines transmembranaires sont impliqués dans la circularisation de la garvicine chez *Lactococcus garvieae* DCC43. En effet, la délétion de ces gènes a conduit à la formation de la forme linéaire de la garvicine.

### **3.2. Classe II, bactériocines non modifiées de faible masse moléculaire (moins de 10 kDa)**

La classe II constitue un groupe relativement hétérogène de bactériocines de faible masse moléculaire (moins de 10 kDa). Elles ont la particularité d'être thermostables et de ne pas subir de modifications post-traductionnelles. Bien qu'elles soient le plus souvent synthétisées sous forme de pré-peptides, dont la séquence leader N-terminale est clivée, elles ne nécessitent pas d'enzymes pour leur maturation hormis une peptidase leader et/ou un transporteur. Cette classe comprend une grande variété de structures, ce qui a conduit à la création de plusieurs sous-classes.

#### **3.2.1. Bactériocines de classe IIa, ou bactériocines de type pédiocine (Pediocin-like)**

Les bactériocines de classe IIa, connues sous le nom de bactériocines de type pédiocine, sont des polypeptides linéaires comptant jusqu'à 60 acides aminés qui sont dotés d'une forte activité anti *Listeria*, y compris *Listeria monocytogenes*. De plus, elles sont capables de tuer les bactéries cibles à des concentrations de l'ordre du nanomolaire (Cotter et al., 2005).

Ces polypeptides linéaires possèdent dans leur domaine N-terminal une séquence conservée de cinq acides aminés (YGNGV), appelée la "pédiocine-box" (Drider et al., 2006; Belguesmia et al., 2011). Néanmoins, dans certains cas, cette séquence peut être altérée par le remplacement de la valine par la lysine (Nissen-Meyer et al., 2010). Par ailleurs, cette pédiocine-box est incluse dans la séquence conservée YGNGVxCxK/NxxC (où X est un acide aminé quelconque) de la région N-terminale (Drider et al., 2006). Les deux cystéines présentes dans cette séquence vont former un pont disulfure qui va aider à la stabilisation de la structure de la bactériocine.

Les gènes impliqués dans la biosynthèse des bactériocines de classe IIa sont souvent situés dans le même opéron ou dans deux opérons distincts. Généralement, ces opérons contiennent un gène structurel qui code pour le pré-peptide et d'autres gènes qui codent pour une protéine d'immunité, un transporteur ABC (ATP-binding cassette), une protéine accessoire pour la translocation extracellulaire de la bactériocine et dans plusieurs cas, deux protéines régulatrices. Les bactériocines de classe IIa sont aussi synthétisées sous forme de pré-peptides inactifs avec une séquence leader située à l'extrémité N-terminale. Le peptide leader est souvent clivé au niveau d'une double glycine lors de l'exportation par le transporteur ABC, afin que le peptide mature soit libéré dans le milieu extracellulaire. Certaines bactériocines de classe IIa, tels que l'entéroccine P produite par *Enterococcus faecium* P13 et la bactériocine T8 produite par *E. faecium* T8 sont exportées dans le milieu extracellulaire par un système Sec-dépendant (Cintas et al., 1997; De Kwaadsteniet et al., 2006).

### **3.2.2. Bactériocines de classe IIb, ou bactériocines à deux peptides**

Ces bactériocines sont composées de deux peptides différents (généralement nommés  $\alpha$ - et  $\beta$ -peptide) et présentent une activité antimicrobienne élevée à partir d'une concentration de l'ordre du pico- au nano-molaire. Généralement, l'activité optimale est obtenue pour un mélange équimolaire des deux peptides, à noter qu'un peptide seul est inactif ou faiblement actif. De plus, la combinaison de l'un des deux peptides avec le peptide complémentaire d'une autre bactériocine homologue peut donner une activité similaire. En effet, lorsque l'un des peptides de la lactococcine G a été combiné avec le peptide complémentaire de la lactococcine Q ou de l'entéroccine 1071, une activité similaire à celle des deux peptides natifs combinés a été obtenue (Nissen-Meyer et al., 2010).

Des études structurales réalisées sur la lactococcine G (Hauge et al., 1998; Rogne et al., 2008), la plantaricine EF (Hauge et al., 1999, 199; Fimland et al., 2008) la plantaricine JK (Rogne et al., 2009), la carnobactériocine XY (Acedo et al., 2017) et la plantaricine S (Ekblad and Kristiansen, 2019) ont révélé le comportement et l'interaction des deux peptides en fonction de l'environnement. En solution aqueuse, les peptides ne sont pas structurés et n'interagissent pas entre eux. En revanche, dans un environnement hydrophobe, ils adoptent une structure hélicoïdale et lorsqu'ils sont en présence de liposomes membranaires, les peptides complémentaires se replient et interagissent entre eux.

Tous les peptides de cette classe de bactériocines contiennent à l'intérieur de leurs domaines hélicoïdaux au moins un motif **GxxxG**, à l'exception de la plantaricine S $\beta$  et de la plantaricine

NC8 $\beta$ , où le motif **GxxxG** est remplacé par le motif **AxxxA** (pour la plantaricine S $\beta$ ) et **SxxxS** (pour la plantaricine NC8 $\beta$ ) (Nissen-Meyer et al., 2010). Ces motifs sont connus pour médier les interactions hélice-hélice dans les protéines membranaires (Senes et al., 2004).

### **3.2.3. Classe IIc, bactériocines sans séquence leader**

Les bactériocines de classe IIc ne subissent aucune modification post-traductionnelle et sont dépourvues de séquence leader. Ces bactériocines sont synthétisées directement sous leur forme active, ce qui interroge sur les mécanismes d'immunité de la cellule productrice des bactériocines (Perez et al., 2014). Ce groupe est très hétérogène, notamment en ce qui concerne le nombre de peptides composant la bactériocine mature, pouvant être des bactériocines mono-peptidiques, à deux, trois ou quatre peptides.

### **3.2.4. Classe IId, bactériocines mono-peptidique**

La classe IId est constituée d'un groupe de bactériocines hétérogènes dont la principale caractéristique est d'être des mono-peptides linéaires qui ne présentent pas de motifs communs aux Pediocin-like, comme la lactococcine A, la lactococcine 972 ou l'entéroccine B (Alvarez-Sieiro et al., 2016).

## **3.3. Classe III, bactériocines non modifiées de plus de 10 kDa avec un mécanisme d'action bactériolytique ou non lytique**

La classe III comprend toutes les bactériocines thermolabiles ayant une masse moléculaire élevé (supérieur à 10 kDa). En général, elles sont constituées de plusieurs domaines qui peuvent avoir des fonctions différentes, telles que la translocation, la liaison à un récepteur ou l'activité létale (Cotter et al., 2005, 200; Alvarez-Sieiro et al., 2016).

Les gènes de biosynthèse des bactériocines de classe III, incluant les gènes de structure et d'immunité, sont souvent portés par des plasmides. C'est le cas du gène de la lysostaphine (*Iss*), une bactériocine produite par *Staphylococcus simulans* biovar staphylolyticus ATCC1362 et de son gène d'immunité (*lif*). Comme la plupart des bactériocines, la lysostaphine est produite sous forme de propeptide. Cependant, la séquence N-terminale du peptide leader est clivée pendant sa sécrétion par une protéase à cystéine. Les gènes *Iss* et *lif* sont entourés de séquences d'insertion, ce qui suggère que *S. simulans* a pu recevoir ces gènes par un transfert horizontal (Thumm and Götz, 1997; Bastos et al., 2010).

Il en est de même pour l'entérolysine A qui est une bactériocine de classe III produite par *Enterococcus faecalis* LMG 2333, active contre *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* et *Lactobacillus* (Nilsen et al., 2003). Cette bactériocine est produite sous la forme d'une préprotéine de 343 acides aminés avec un peptide leader de 27 acides aminés, suivi d'une séquence correspondant à la région N-terminale de la protéine mature. L'analyse de la séquence de l'entérolysine A a révélé la présence de deux domaines distincts, un domaine catalytique en N-terminal et un domaine de reconnaissance du substrat en C-terminal. De plus, la région N-terminale présente des homologies avec des séquences de domaines catalytiques de différentes protéines de dégradation de la paroi cellulaire à structure modulaire, telles que ALE-1, et LytM qui sont toutes deux des endopeptidases appartenant à la famille des protéases M37 (Barrett and Rawlings, 1996; Nilsen et al., 2003).

#### **4. Les principaux modes d'action et les mécanismes d'immunité des bactériocines produites par les bactéries lactiques**

Les bactériocines produites par les BLs peuvent être utilisées comme alternative aux antibiotiques conventionnels. Elles peuvent être utilisées seules, ou dans certains cas comme agents potentialisateurs pour traiter les infections bactériennes. De même, elles peuvent également être utilisées dans la bio-préservation des aliments. Si l'on veut envisager les applications cliniques des bactériocines produites par les BLs comme une approche thérapeutique raisonnable et souhaitable, il est donc nécessaire de comprendre leurs modes d'action et les mécanismes de résistance développés par les bactéries productrices pour se protéger contre leurs propres bactériocines.

La plupart des modes d'action des bactériocines produites par les BLs sur les bactéries à Gram-positif sont connus et décrites dans la littérature. Certaines d'entre elles vont perturber la membrane cytoplasmique par la formation de pores, tandis que d'autres vont inhiber la biosynthèse de la paroi cellulaire ou la dégrader. Toutefois, certaines bactériocines produites par les BLs présentent un mode d'action qui n'est pas encore caractérisé, notamment celles qui sont actives contre les bactéries à Gram-négatif. En ce qui concerne l'immunité, la plupart des souches productrices de bactériocines possèdent un mécanisme d'immunité leur permettant de se protéger contre leurs propres bactériocines. Ce mécanisme d'immunité peut impliquer une protéine d'immunité et/ou un système de transport de type ABC (ATP-Binding Cassette) dédié. Cependant, ces mécanismes d'immunité varient d'une bactériocine à une autre.



Dans la revue qui va suivre, les différentes modes d'action des bactériocines produites par les BLs ainsi que leurs mécanismes d'immunités associés, vont être abordés. En effet, leur compréhension permettrait de prévenir l'émergence de bactéries potentiellement pathogènes et l'apparition de résistances aux bactériocines.

**Publication 1 : Connaissance actuelle des modes d'action et  
des mécanismes d'immunité des bactériocines produites  
par les BLs**

Current knowledge of the mode of action and immunity  
mechanisms of LAB-bacteriocins



# Current Knowledge of the Mode of Action and Immunity Mechanisms of LAB-Bacteriocins

Adrián Pérez-Ramos †, Désiré Madi-Moussa †, Françoise Coucheney, Djamel Drider \*

UMR Transfrontalière BioEcoAgro 1158, Univ. Lille, INRAE, Univ. Liège, UPJV, YNCREA, Univ. Artois, Univ. Littoral Côte d'Opale, ICV—Institut Charles Viollette, F-59000 Lille, France;

adrian.perez-ramos@univ-lille.fr (A.P.-R.); desire.madimoussa.etu@univ-lille.fr (D.M.-M.);

francoise.coucheney@univ-lille.fr (F.C.)

\* Correspondence: djamel.drider@univ-lille.fr

† These authors contributed equally to this work.

**Abstract:** Bacteriocins produced by lactic acid bacteria (LAB-bacteriocins) may serve as alternatives for aging antibiotics. LAB-bacteriocins can be used alone, or in some cases as potentiating agents to treat bacterial infections. This approach could meet the different calls and politics, which aim to reduce the use of traditional antibiotics and develop novel therapeutic options. Considering the clinical applications of LAB-bacteriocins as a reasonable and desirable therapeutic approach, it is therefore important to assess the advances achieved in understanding their modes of action, and the resistance mechanisms developed by the producing bacteria to their own bacteriocins. Most LAB-bacteriocins act by disturbing the cytoplasmic membrane through forming pores, or by cell wall degradation. Nevertheless, some of these peptides still have unknown modes of action, especially those that are active against Gram-negative bacteria. Regarding immunity, most bacteriocin-producing strains have an immunity mechanism involving an immunity protein and a dedicated ABC transporter system. However, these immunity mechanisms vary from one bacteriocin to another.

**Keywords:** lactic acid bacteria; bacteriocin; antimicrobial peptide; mode of action; immunity

**Citation:** Pérez-Ramos, A.; Madi-Moussa, D.; Coucheney, F.; Drider, D. Current Knowledge of the Mode of Action and Immunity Mechanisms of LAB-bacteriocins.

*Microorganisms* **2021**, *9*, 2107.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms9102107>

Academic Editor: Julio Villena

Received: 9 September 2021

Accepted: 29 September 2021

Published: 7 October 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

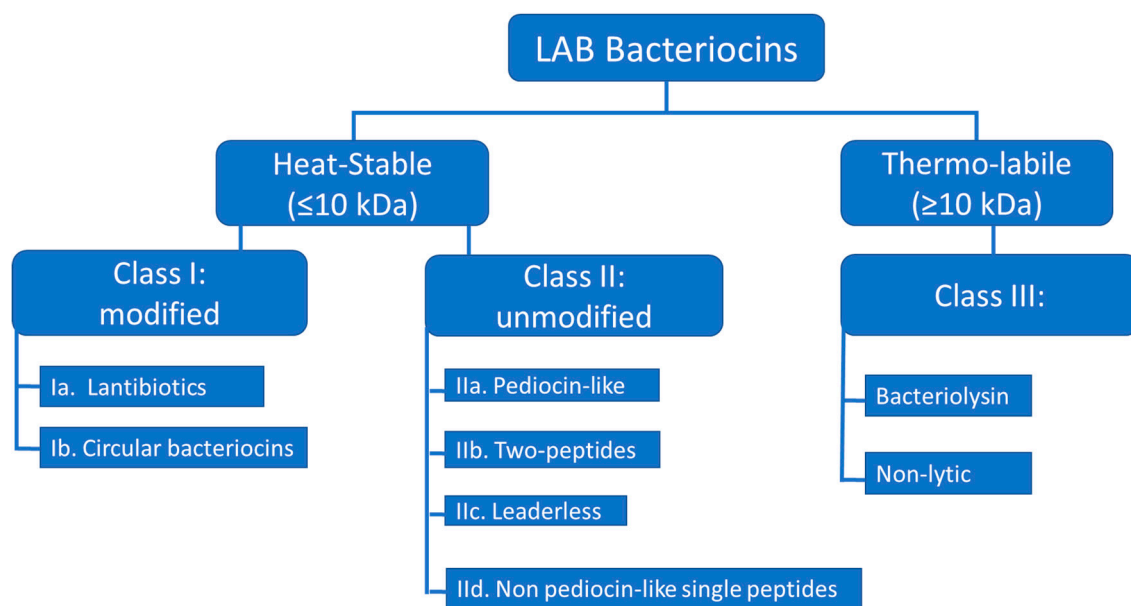
## 1. Introduction

Production of bacteriocins can give a bacterium a competitive advantage in its natural environment. Bacteriocins are synthesized by both Gram-negative and Gram-positive bacteria, and also by *Archaea*, using the ribosomal machinery [1]. LAB-bacteriocins are usually active against phylogenetically related bacteria [2]. Nevertheless, some of them possess a broader spectrum that includes activity against more phylogenetically distant bacteria [3,4]. In this respect it has been reported that LAB-bacteriocins such as bacteriocin OR-7 [5], bacteriocin SMXD51 [6], and E20 fraction [7] are even active against Gram-negative bacteria such as *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli*, including *E. coli* strains carrying *mcr-1* gene, which is responsible for colistin resistance [8]. The mode of action of LAB-bacteriocins against Gram-negative bacteria remains to be understood.

To date, a large number of bacteriocins have been isolated and characterized, which has permitted academic advances and possibilities of potential applications. Related to that, LAB-bacteriocins have been also shown to display other biological functions such as antiviral activity, inhibition of biofilm formation and anti-cancer activity [9,10]. Different classifications of bacteriocins have been proposed and include LAB-bacteriocins as well as those produced by other Gram-positive or Gram-negative bacteria [11–16].

Rebuffat and coworkers [17] have suggested classifying bacteriocins produced by Gram-negative bacteria into two main classes. The first includes high molecular mass modular proteins (30–80 kDa) termed colicins-like, whilst the second contains low

molecular mass peptides (from 1 to 10 kDa) termed microcins-like. Recently, a novel classification containing bacteriocins from Gram-positive bacteria and Gram-negative bacteria has been proposed by Soltani et al. [16], and also proposes two main classes. The first contains ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs) and the second encompasses unmodified peptides [16]. Importantly, there is not a common, universally accepted classification and this issue has to be considered as important by the growing scientific community dedicated to bacteriocins. In this review, we will be mostly referring to the classification proposed by Alvarez-Sieiro et al. [14], which categorizes LAB-bacteriocins into three main classes (Figure 1). Class I consists of low molecular weight bacteriocins ( $\leq 10$  kD), carrying post-translational modification characterized by the presence of unusual amino acids (lanthionin), class II consists of other low molecular weight bacteriocins ( $\leq 10$  kD) which do not undergo post-translational modification and class III consists of all high molecular weight bacteriocins (10 kD).



**Figure 1.** Suggested classification scheme for LAB-bacteriocins, adapted from Alvarez-Sieiro et al. [14].

Applications of LAB-bacteriocins have been mostly limited to the food sector [18,19], and only the lantibiotic nisin (E234) and, to a lesser extent, the pediocin PA-1/AcH are currently approved and commercialized as a food preservative by the Food and Drug Administration (FDA) [20]. Further bacteriocins such as colicins and salmocins, which are produced by Gram-negative bacteria are considered by the FDA [21]. Nevertheless, safe and potent antibacterial agents, such as LAB-bacteriocins, are expected to be used in the framework of the novel approach to food preservation, named biopreservation; a method which is gaining in importance and meeting societal and industrialists' expectations, in terms of substitution of currently used chemicals, and food shelf-life extension. In addition, LAB-bacteriocins has others potential applications such as treatment or prevention of diseases and human/animal health (Table 1).

**Table 1.** Overview on the potential of LAB-bacteriocins applications.

Class	Bacteriocin	Producer bacteria	Applications	Reference
Class I Lantibiotic	Nisin	<i>Lactococcus lactis</i> spp.	Food industry: natural preservative, inhibits most of the food-borne pathogens	[18]

			Human health: infection diseases, oral care, cancer therapy	[22]
	GP15cin	<i>Lactobacillus plantarum</i> GP15	Patented bacteriocin for control of unwanted bacteria in ethanol fermentation plants	[8]
	Salivaricin A2/B	<i>Streptococcus salivarius</i> K12	Active against Halitosis producing bacteria and <i>Streptococcus pyogenes</i> , which causes pharyngitis	[23,24]
	Lacticin 3147	<i>Lactococcus lactis</i> 3147	Inhibits the growth of many Gram-positive food-borne pathogens	[25]
			Treatment for bovine mastitis	[26]
Class I cyclic	Enterocin AS-48	<i>Enterococcus faecalis</i> subsp. <i>liquefaciens</i>	promising perspectives to be used as biopreservatives in food	[27]
			Active against uropathogenic enterococci	[28]
	Pediocin PA-1	<i>Pediococcus acidilactici</i> PAC1.0	Food industry: natural preservative	[29]
			Potential activity against fish pathogens	[30]
	ST4V	<i>Enterococcus mundtii</i> ST4SA	antibacterial and antiviral activity	[31]
			effective against middle ear infections	[32]
	Staphylococcin 188	<i>Staphylococcus aureus</i> AB188	Anti-enterococci and antiviral activity	[33]
Class IIa Pediocin-like	Enterocin CRL35	<i>Enterococcus faecium</i> CRL35	Anti-Gram-positive pathogens and anti-Gram-negative pathogens when hybridized to microcin V	[34]
	ST5H	<i>Enterococcus faecium</i> ST5Ha	Active against human food pathogens and virus	[35]
	Fermentacin HV6b	<i>Lactobacillus fermentum</i> HV6b MTCC	inhibits pathogens which causes vaginal infections in humans and has a spermicidal activity.	[36]
	Pediocin K2a2–3	<i>Pediococcus acidilactici</i> K2a2–3	Anti-cancer activity against HT-29 colon adenocarcinoma cells	[37]
Class IIb two-peptide	Durancin A5-11a/b	<i>Enterococcus durans</i> A5-11	Antifungal activity	[38]
	Plantaricin EF	<i>Lactobacillus plantarum</i> NCIM8826-R	Anti-inflammatory effect and reduction of weight in obese mice	[39]

	Abp118	<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118	Enhancement of the bacteria probiotic effect and modulation of the mouse and pig intestinal microbiota	[40]
Class IIc Leaderless	Enterocin SL-5	<i>Enterococcus faecalis</i> SL-5	Active against inflammatory acne lesions caused by <i>Propionibacterium acnes</i>	[41]
Class III	Lysostaphin	<i>Staphylococcus simulans</i>	Active against <i>Staphylococcus aureus</i> and other pathogens of endometritis sows	[42,43]

As mentioned above, LAB-bacteriocins have been shown to display multiple biological functions [9,10]. Nonetheless, replacement of traditional antibiotics or potentiating their activity is timely, because of the increasing antimicrobial resistance in the globe and the lack, in some cases, of therapeutic alternatives. Bacteriocins, and ultimately LAB-bacteriocins may help to save us from a well-acknowledged crisis.

To protect themselves from their own bacteriocins, producing strains have developed different mechanisms to overcome the toxicity of their own bacteriocin arsenal. [12,44,45]. Genes coding for bacteriocins and those coding for immunity proteins are usually located in the same cluster and are often co-regulated.

This review discusses the mode of action and immunity mechanisms of LAB-bacteriocins and highlights recent and pertinent advances achieved in these fields. We will also show how the immunity systems, and mode of actions, can be connected. Overall, understanding advances achieved in these fields can help improve LAB-bacteriocin production rates as well as in the engineering of novel bacteriocins with potent antibacterial activity.

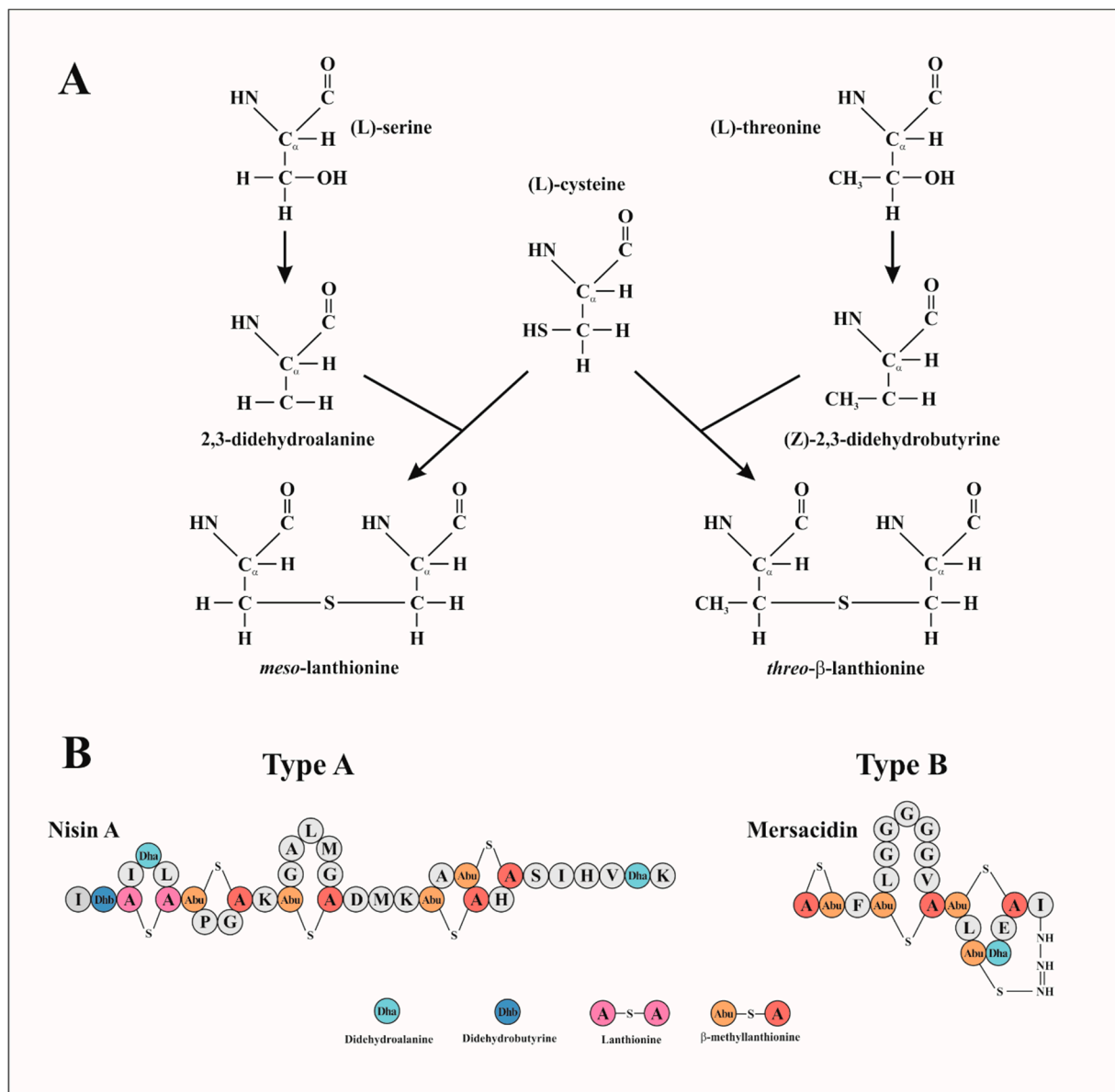
## 2. RiPPs, the Bacteriocins with Versatile Modes of Action

RiPPs belong to a group of antimicrobial peptides (AMP) known for their ability to undergo post-translational enzymatic modifications during their biosynthesis. As mentioned above, these AMP contain unusual amino acids and structures which play a major role in their antimicrobial activity (e.g., lanthionine, heterocycle, head-to-tail cyclization, glycosylation). They are produced by *Archaea*, as well as by bacteria and eukaryotic cells, and their classification is based on the post-translational modifications [46].

### 2.1. Class Ia: Lantibiotics

Lantibiotics are low molecular weight RiPPs which contain unusual dehydroamino acids such as the thioether amino acids lanthionine (Lan) and/or  $\beta$ -methyllanthionine (Me-Lan) and various other modified residues, such as  $\alpha,\beta$ -unsaturated amino acids 2,3-didehydroalanine (Dha) and 2,3-didehydrobutyrine (Dhb) resulting from the dehydration of serine and threonine residues, respectively. They can next form thioether  $\beta$ -carbon linkages with cysteines (Figure 2A) [44]. These unusual amino acids play an important role in the rigidity of the peptide and its resistance to proteolytic degradation and to heat treatment [47].

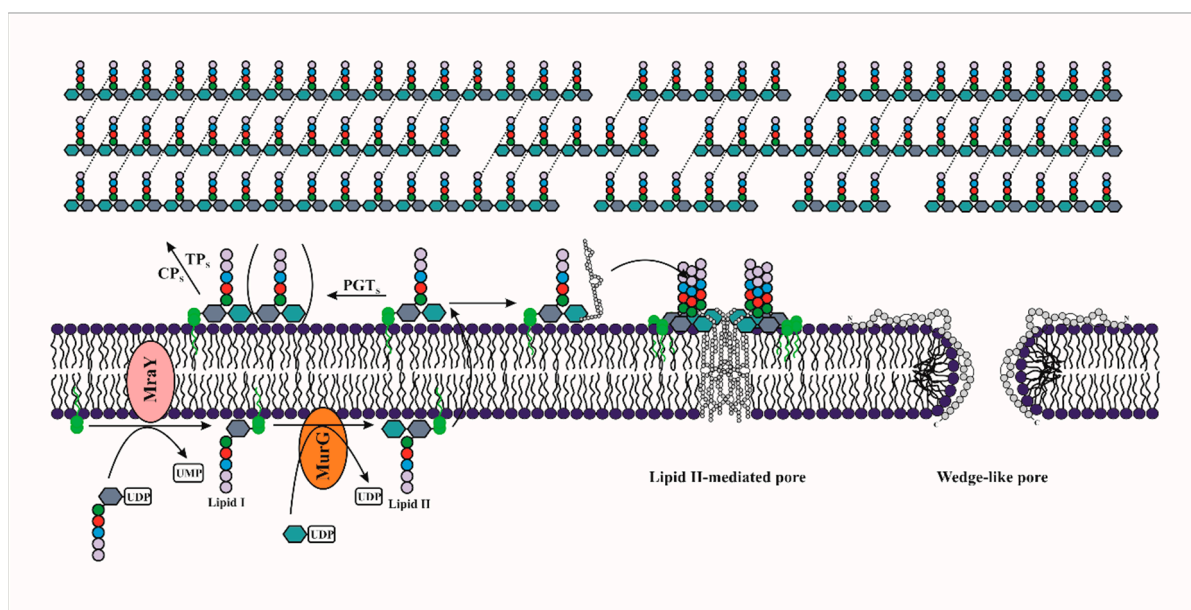
Lantibiotics are subdivided into types A and B, according to their structural and functional characteristics (Figure 2B) [48]. Type A lantibiotics, includes nisin, epidermin and subtilin are cationic and linear peptides with similarities in the arrangement of their Lan bridges. They act on the membrane of their targets by pore-forming leading to the leakage of small molecules [49]. Type B lantibiotics include duramycin, mersacidin and actagardin which are globular peptides that inhibit the synthesis of the cell wall of their targets by disrupting the enzyme function.



**Figure 2.** (A) Biosynthesis of the thioether lanthionines during lantibiotic maturation. Dha (2,3-didehydroalanine) and Dhb (2,3-didehydrobutyryne) are obtained from the dehydration of L-serine and L-threonine, respectively. Then, Dha and Dhb react with L-cysteine to form a Lan thioether resulting in lanthionine (*meso*-lanthionine) and β-methylanthionine (*threo*-β-lanthionine), respectively. Lantibiotics are divided in two types, A and B. (B) Molecular structure of nisin A (type A), and mersacidin (type B), where the modified amino acids are highlights in different colors. Adapted from McAuliffe et al. [44].

### 2.1.1. Mechanism of Action of Lantibiotics

Lantibiotics act by disrupting the cell wall biosynthesis of their target bacteria, or/and by forming a pore in their membranes. Of note, lantibiotics have been shown to bind to lipid II and interfere with the transport of peptidoglycan subunits from the cytoplasm into the cell wall and consequently inhibit cell wall formation. They can also use lipid II as a docking molecule to initiate pore formation and lead to rapid cell death (Figure 3) [45,50,51].



**Figure 3.** Scheme showing the mechanism of action for lantibiotic bacteriocins, mainly forming a pore into the target membrane by electrostatic interaction (wedge-like pores) or by binding to lipid II. Lipid II is formed in two steps: (i) the UDP-N-acetylmuramyl-pentapeptide is linked to the undecaprenyl phosphate by the enzyme MraY to obtain the lipid I; (ii) then, a unit of N-acetylglucosamine is linked to the N-acetylmuramyl by the enzyme MurG to obtain the final lipid II. After its formation, the lipid II is translocated across the membrane to the outer side, and oligomerized to form the cell wall. The cationic type-A lantibiotics (like nisin, depicted in the figure) can form a target-mediated pore using lipid II as a docking molecule. In addition, the hijacking of lipid II molecules for the formation of pores in the membrane can destabilise the formation of the wall, thereby weakening it.

#### A) Pore formation

Lantibiotics can interact with the cytoplasmic membrane of their targets and form pores [52]. These peptides of generally cationic nature can cause the dissipation of the proton motive force (PMF), through the formation of pores in the cytoplasmic membrane [44]. The PMF results from the electrochemical gradient of protons across the cytoplasmic membrane, it is constituted of an electrical component, the membrane potential ( $\Delta\Psi$ ), and a chemical component, the pH gradient ( $\Delta\text{pH}$ ) [53,54]. The disruption of the PMF induced by the bacteriocin, leads to cell death by stopping the reactions requiring energy.

Type A lantibiotics such as nisin, Pep5, subtilin, lactacin 3147 and streptococcin FF22, form pores in the membranes of the target cells in a process of several steps, starting from the interaction of the bacteriocin with the membrane to its insertion in the phospholipid bilayer that causes the release of low molecular weight intracellular compounds such as amino acids, ions and ATP [55–57]. These cationic peptides interact with the anionic surface of the cytoplasmic membrane. The C-terminal region containing the majority of positively charged residues binds to the head group of anionic phospholipids in the cytoplasmic membrane by electrostatic interactions [58]. The insertion of lantibiotics into the cytoplasmic membrane is generally mediated by the hydrophobic residues of their N-terminal region (Figure 3) [59].

Two different models of pore formation by lantibiotics have been proposed: "barrel-stave" and "wedge" models [60]. In the barrel-stave model, the lantibiotic monomers bind by electrostatic interaction to the outer leaflet in an orientation parallel to the membrane surface. Thus, a water-filled pore is formed following the interaction of the hydrophobic lipid core of the membrane with the non-polar side chains of the bacteriocin. The size and stability of the barrel-stave pore depends on the number of peptides involved [56,60]. However, in the wedge model, a local deformation of the membrane is observed due to the interaction between cationic bacteriocins and the head groups of the phospholipids which are anionic allowing the insertion of the hydrophobic residues of the bacteriocin inside the membrane (Figure 3) [61].



The formation of the pores in the cytoplasmic membrane is accompanied by an increase of the free energy [62]. The electrical transmembrane potential ( $\Delta\psi$ ), generated by bacterial cells in the metabolic phase is considered as the main driving force for activity. Experiments on black lipid membranes (which are lipid membrane models used for the investigation of biomembrane properties) indicated that when the trans-negative electrical potential is reached the nisin formed pores, the similar orientation is obtained in the bacterial membrane. [55,63]. Similarly, the pore formation can be impacted by pH. Garcera et al. [64] reported that at high pH, the nisin monomers aggregate outside the membrane, which significantly reduces its activity.

Pore formation can be enhanced by the association of lantibiotics with the polyisoprenoid-linked cell wall precursor, lipid II. Its structure is highly conserved in bacteria, and consists of a pentapeptide bound to the disaccharide unit N-acetylmuramyl-N-acetylglucosamine (MurNAc-GlcNAc), as well as a bactoprenol carrier lipid (C55-P), which is linked to the disaccharide unit via a pyrophosphate bridge [65]. Nisin and epidermin, use lipid II as an anchor molecule to bind specifically to the cytoplasmic membrane. Moreover, the presence of lipid II causes pore stabilization and enhances the sensitivity of the target membrane to nisin (Figure 3) [51,66]. *In vitro* experiments have shown that the presence of lipid II significantly increases the activity of nisin (from a micromolar to nanomolar concentration) [67]. NMR analysis of the interaction of nisin and lipid II has shown a network of five intermolecular hydrogen bonds between the peptide backbone of nisin and the pyrophosphate domain [68]. Similarly, other studies revealed the presence of a conserved motif in the N-terminal region that would be involved in the binding to lipid II and this motif is present in some type A(I) lantibiotics such as subtilin, epidermin, gallidermin and mutacin [69]. In addition to forming highly specific pores, nisin can also inhibit cell wall synthesis through its binding to lipid II, as we detail in the next section. The combination of two mechanisms of action increases markedly the bactericidal activity, being effective even down to the nanomolar range [51].

#### B) Inhibition of peptidoglycan biosynthesis mediated by Lipid II interaction

Lantibiotics such as gallidermin that bind to lipid II kill bacteria without permeabilizing their membranes, indicates another lipid II-mediated mode of action [70]. Indeed, the type-B lantibiotics mersacidin and actagardin, whose structures are completely different from nisin, impede the transglycosylation reaction during biosynthesis of the peptidoglycan by forming a complex with lipid II (Figure 3). Of note, it was established in the *Staphylococcus simulans* 22 strain, that mersacidin blocks the incorporation of glucose and D-alanine into the cell wall, thus stopping its biosynthesis and leading to cell death [60]. *In vitro* studies performed on membranes capable of synthesizing peptidoglycan showed that inhibition of peptidoglycan synthesis by mersacidin was dependent on the availability of lipid II [60,71].

The highly conserved cyclic structure in both lantibiotics could be involved in the antibacterial activity. Comparison of mersacidin with other similar lantibiotics suggests the presence of a conserved motif in the N-terminal region that is involved in lipid II binding [72]. The binding site of mersacidin and actagardin on lipid II is not the same as that of nisin, they interact mainly with the disaccharide-pyrophosphate fraction of lipid II [71,73].

#### C) Other mechanisms of action

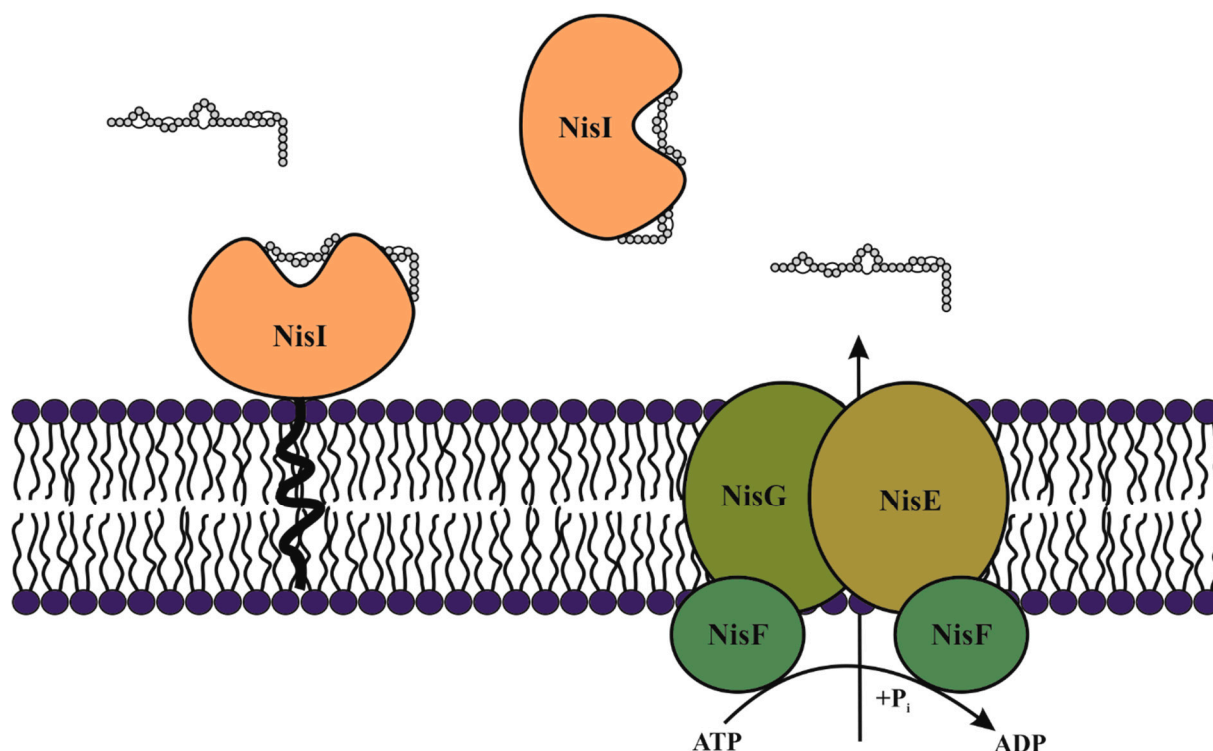
Bierbaum and Sahl [74] showed that both nisin and Pep5 can induce autolysis in staphylococci. They suggested that nisin and Pep5 bind to lipoteichoic and teichoic acids and displace the enzymes N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase and N acetylglucosaminidase, which normally interact with teichoic acids, leading to activation of the enzymes involved in cellular lysis. Some lantibiotics can act also inhibit the germination of *Bacillus* spores. It has been reported that the mechanism of action of subtilin in *Bacillus cereus* T vegetative cells, or spores can follow different molecular pathways, and also it was observed that the Dha residues at position 5 of the molecule were essential in the inhibition of spores [75].

### 2.1.2. Lantibiotic Immunity

This system consists of an immunity protein (LanI) or an ABC transporter (composed of 2 or 3 LanEF(G) subunits). Both, LanI and LanEF(G) can act independently or interact together to confer autoimmunity. Of note, in some cases, an accessory protein called LanH is involved in this overall self-protection network [44].

The regulation of biosynthesis of many lantibiotics is controlled by a two-component signal transduction system, the histidine kinase (LanK) and the response regulator (LanR). The pre-lantibiotic activates its biosynthesis and other proteins involved in transport and immunity, by acting as a pheromone peptide through a quorum sensing and allowing autophosphorylation of the histidine kinase. LanK transfers its phosphate group onto LanR, which activates the transcription of genes belonging to bacteriocin clusters [14,44,76]. In certain cases there is an independent promoter  $P_{nisI}$ , which provides the cell with a basal level of immunity through a weak constitutive activity, thereby protecting it during its first encounter with nisin [77].

Nevertheless, it has been established that *Lactococcus lactis* nisin producing strains are able to prevent the deleterious effects of its own nisin by using two distinct cooperative mechanisms. The first is related to expression of the specific NisI immunity protein, which is a lipoprotein able to bind to nisin, and thereby prevents it from accessing its predicted target lipid II (Figure 4) [78]. The second mechanism involves the ATP-binding cassette transporter NisFEG, which expels nisin outside of the membrane prior to pore formation [79,80]. These mechanisms involving NisI and NisFEG were among the first reported, since full immunity was only observed in the presence of both proteins (Figure 4) [81]. Moreover, other studies also showed the influence of both systems, and reported immunity levels of 5-20% for each mechanism [81,82]. A modification of the lipid profile allowed the anchoring of NisI extracellular side of the membrane, but a lipid-free form of the NisI also exists, secreted into the surrounding medium, and both forms were shown to bind nisin [79,83]. NisFEG seemed to recognize the C-terminal domain of nisin since deletion of the last six amino acids and last ring lowered the degree of immunity displayed by NisFEG [84]. Nevertheless, knowledge of the physiology and regulation of genes involved in this self-immunity is limited. Involvement of other genes in nisin immunity through direct or indirect interactions has been reported by Zhu et al. [85]. These authors established that the Mu-transposon occurring within the chromosomal *feuD* gene in *L. lactis* N8 provided a derivative strain *L. lactis* L58 with an enhanced nisin immunity system. Interestingly, the gene cluster *feuABCD* encoding for an ATPase of the ABC-type cobalamin/Fe<sup>3+</sup> siderophores transporter FeuABCD including FeuD has been observed in many bacterial species [86]. This result suggested that FeuD was a component of transporter FeuABCD.



**Figure 4.** Mechanisms of immunity in the nisin producing *L. lactis* to protect itself from the action of the nisin. The lipoprotein NisI can be anchored to the membrane or released into the medium, and in both cases, it is able to bind to nisin, inhibiting pore formation. The ABC transporter NisEFG expels nisin from the membrane, thus avoiding pore formation.

Similarly, the Gram-positive *Bacillus subtilis* has similar mechanisms to prevent toxicity of subtilin. This occurs through expression of the SpaI immunity protein and ABC transporters SpaFEG [87]. Recently, expression of SpaI and NisI in a subtilin nonproducing strain, permitted responsive resistance to both lantibiotics [88]. NMR resolution of NisI lipoprotein revealed two structurally similar domains, namely N- and C-terminal domains, which are homologous to SpaI [78,89]. The N-domain interacts with the membrane, whereas the C-terminal domain plays a role in the nisin recognition [78,89]. The N-terminal domain (1-111 residues) is linked to the C-terminal domain (112-226 residues) through a flexible linker (112-119 residues) [90]. Recently, it was reported that the inter-domain of NisI could form a deep cleft and a groove which is recognized as a binding site for nisin, among other molecules [91].

Whilst knowledge on NisI and NisFEG is increasing, it is important to know whether these mechanisms are unique or interchangeable, as recently reported for subtilin [88].

Although subtilin is the lantibiotic sharing the closest similarity with nisin (i.e. 63% sequence identity), the SpaI-NisI fusion protein, expressed in *L. lactis*, where the corresponding 21 amino acid fragment of the subtilin immunity peptide, SpaI, has been replaced by that of NisI conferred immunity to nisin, confirming that the specific protective capabilities against nisin are located at the C-terminus of the LanI proteins [78].

In contrast, the immunity protein PepI that protects the *Staphylococcus epidermidis* strain from its own bacteriocin Pep5 has a different mode of action than nisin. Indeed, this protein, containing an apolar N-terminal and a positively charged hydrophilic C-terminal region, accumulates at the interface of the membrane-cell wall. Experiments aimed at disrupting the N-terminal or the C-terminal region of PepI have shown that the N-terminal region is required for the transport of PepI, and the C-terminal region is important to confer the immunity phenotype [92].

## 2.2. Class Ib or Circular Bacteriocins

Circular bacteriocins are peptides post-translationally circularized by a head-to-tail peptide bond. This is particularly important to ensure high resistance to temperature and pH variations and protection against many proteases. Circular bacteriocins are produced by Gram-positive bacteria mainly from the *Firmicutes* phylum. They are classified into two groups based on their sequence homologies, and their physico-chemical characteristics. Group I contains circular cationic bacteriocins with high isoelectric point, whereas group II contains circular and highly hydrophobic bacteriocins with more acidic residues, and low isoelectric points [93].

### 2.2.1. Mode of Action of Circular Bacteriocins

The biochemical and biological characteristics of many of these bacteriocins are well-known, especially enterocin AS-48 (AS-48), which has been widely studied and reviewed [93–97]. AS-48 was the first circular bacteriocin to be described. It is produced by *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* strain S-48 [98], and is considered as the prototype of this family. Its active form is a cationic circular peptide of 70 residues and a molecular weight of 7.1 kDa, folding in an all- $\alpha$ -helix with five helical regions, where the recircularization of the backbone occurs in the middle of helix  $\alpha_5$  [94]. Its mechanism of action has been thoroughly investigated, but there are still issues to be clarified. AS-48 has the cytoplasmic membrane as its target, where it destabilizes the membrane leading to the dissipation of the proton motive force and cell death. Crystallographic studies showed that the protein dimerizes and undergoes a transition from a dimer water-soluble form (DF-I) to a dimer membrane-bound state (DF-II) [99]. Dimer formation in DF-I is mediated by hydrophobic interactions, whereas in DF-II hydrophilic contacts occur between protomers, a hydrophobic surface is exposed to the hydrophobic core of the membrane and a polar surface remains in contact with the solvent. The experimental data suggest that AS-48 in the DF-I form reaches the membrane by an electrostatic approach. The acidic pH in the membrane surface would protonate the glutamic acids allowing the interactions with the phospholipids and leading the destabilization of the DF-I form. This situation would promote a rearrangement of the dimer provoking its insertion into the membrane and adopting the DF-II form [100]. Simulations of membrane permeation suggested that the protein inserted could organize itself to generate stable pores [101,102], however there are no experiments to support this. In addition, there is no evidence of the requirement for a membrane receptor for the bactericidal action of AS-48. Nevertheless, it was reported that the bactericidal activity of garvicin ML against *L. lactis* increased in the presence of the maltose ABC transporter, suggesting that this membrane protein could be involved in the antimicrobial activity [103].

N-terminal regions of circular bacteriocins carry several aromatic and/or hydrophobic amino acids suggesting that these residues play a key role in the biosynthesis and probably the antimicrobial activity [96]. Recently, a structural alignment study of different circular bacteriocins revealed the involvement of charged and aromatic conserved amino acids in antimicrobial activity [104]. Indeed, the authors showed that the substitution of phenylalanine and tryptophan residues by alanine by site-directed mutagenesis of the bacteriocin plantacyclin B21AG produced by *Lactiplantibacillus plantarum* B21 resulted in a strong reduction of the activity compared to the wild type.

### 2.2.2. Immunity of Circular Bacteriocins

The genetic determinants for the synthesis, transport and immunity of circular bacteriocins are clustered in one or several operons, which are located on plasmids or on the chromosome. A cluster of ten genes, *as-48ABCC<sub>1</sub>DD<sub>1</sub>EFGH*, located on the 68 kbp pheromone-response plasmid pMB2, has been described for AS-48 production [105]. Northern blotting studies demonstrated that they work as two coordinated operons, *as-48ABC* and *as-48C<sub>1</sub>DD<sub>1</sub>EFGH* respectively [106]. Both are essential for bacteriocin production and immunity. Recently, the promoters involved in the expression of both operons have been investigated and, also, an additional promoter involved in *as-48D<sub>1</sub>EFGH* expression was

confirmed [107]. D<sub>1</sub> was first described as the immunity protein due to it conferring, by itself, a certain degree of bacteriocin resistance [108]. However, it has subsequently been reported that protein C plays an auxiliary role in self-protection [109]. Both are integral membrane proteins with two (D<sub>1</sub>) or four (C) putative transmembrane domains. Nevertheless, the mechanism of action by which they exert their immune function has not been elucidated, although it is speculated that they may interact with the putative pores formed by the bacteriocin. The *as-48EFGH* genes encode a secondary ABC transporter also involved in self-protection. It conferred higher resistance when AS-48 was added into the medium, therefore it was postulated that this ABC transporter enhances the secretion of bacteriocin by expelling it from the membrane [106]. But this transporter cannot export the newly synthesized bacteriocin; that is carried out only by the main transporter formed by the C<sub>1</sub>D proteins. Then, the combined expression of the complementary ABC transporter and the membrane proteins C and D<sub>1</sub> are required to render a full immunity against AS-48.

A similar immunity system was reported for circularin A, where *cirGHI* genes encode a multicomponent ABC transporter identical to that of AS-48, and CirE a transmembrane protein which would act like As-48D<sub>1</sub> [110]. A secondary ABC transporter was also reported for carnocyclin A [111] and for garvicin ML [112], thus it could be presumed to have a similar immunity system to AS-48. Other small transmembrane proteins were identified as immunity proteins in other circular bacteriocins, such as BviE in butyrivibriocin AR10 [113], or UblE in uberolysin [114]. In the latter, the secretory transporter UblCD was reported to confer low levels of immunity.

### 3. Class II, A Group with Not Only Pore Forming Bacteriocins

Class II constitutes a relatively heterogeneous group of low molecular weight bacteriocins (less than 10 kDa). They are characteristically thermostable and unmodified peptides. Although they are most often synthesized as pre-peptides whose N-terminal leader sequence is cleaved, the maturation of class II bacteriocins do not require post-translational modification enzyme except a leader peptidase and/or a transporter. This class includes a wide variety of structures, which has led to the creation of several subclasses.

#### 3.1. Class IIa Bacteriocins, or Pediocin-Like Bacteriocins (PLBs)

Class IIa bacteriocins, known as pediocin-like bacteriocins, are linear polypeptides of up to 60 amino-acids with potent activity against *Listeria*, particularly *Listeria monocytogenes*, able to kill target bacteria at concentrations in the sub-nanomolar range [45,115].

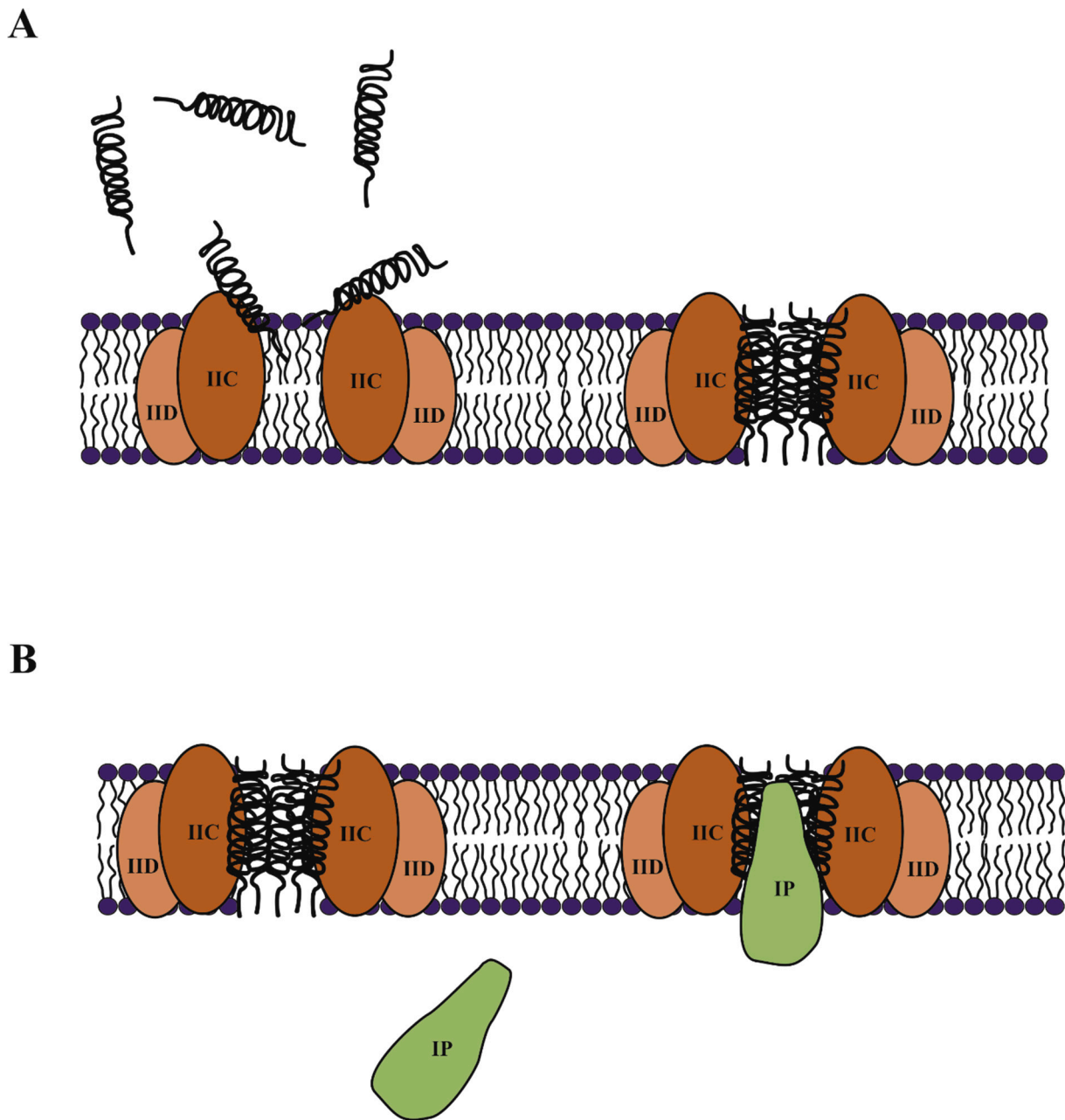
These linear polypeptides have at least two residues of cysteine in the well conserved hydrophilic and charged N-terminal domain [12,116]. A second disulphide bond linkage can exist in the cases of sakacin G, plantaricin 423, pediocin PA-1/AcH, divercin V41, and enterocin A. This second disulfide bridge is expected to stabilize the 3D structure of the C-terminal domain, and correlate with spectrum of activity. Of note, the N-terminal domain of class IIa bacteriocins is recognized by the presence of the “pediocin box”, a sequence of 5 amino acids (YGNGV). Nevertheless, in some cases, this pediocin box can be altered by the replacement of the valine residue by lysine [117]. Finally, this pediocin box is included in the conserved N-terminal domain YGNGVxCxK/NxxC (where X is any amino acid) [12].

##### 3.1.1. Mode of Action of Class IIa Bacteriocins

These bacteriocins acts on the target membranes forming pores that result in the permeabilization of the membranes and cell death. Initially, it was thought that positively charged residues of the C-terminal domain were sufficient for bacteriocin interaction with the membrane, through the anionic phospholipids [12]. The first studies on Pediocin PA-1 showed the ability of this bacteriocin to permeabilize lipidic vesicles, but the authors thought this effect occurred with higher concentrations of bacteriocin than necessary [118–

120]. Thus, they proposed that a docking molecule is needed for a full efficiency of the process. Moreover, Fimland et al. [121], showed that the presence of the fragment derived from pediocin PA-1, peptide 15-mer, inhibited the bactericidal activity of pediocin PA-1, by interfering specifically with the pediocin–target cell interaction. This docking molecule proved to be the membrane-associated EIICD components for the mannose PTS system, which interact directly with the bacteriocin [122]. However, although both components are necessary for the receptor function, it is an extracellular loop in the N-terminal region of the IIC component that provides the specificity in recognition [123]. In addition, the mannose PTS system is clustered into three groups, and only members of group I are recognized by class IIa bacteriocins. All this causes the reduced spectrum of action of these bacteriocins, restricted basically to bacteria phylogenetically related to the producer strains.

The discovery of the interaction of pediocin-like bacteriocins with the IICD components led to the development of two possible models for their mechanism of action: 1) IICD are mere mediators to bring the bacteriocin to the membrane and thus favors its insertion, oligomerization and pore formation; 2) the binding of the bacteriocin to the membrane proteins causes a conformational change in them that leads to the permanent opening of the PTS channel [124]. Although the controversy has existed, recent studies conducted with a suicide probe have elucidated the issue. The studies were carried out in *E. coli* harboring a fused gene of *etpM* and *ent35*. Thus, the suicide probe is a chimeric peptide of the membrane protein EtpM and the class IIa enterocin CRL35 [125]. Enterocin CRL35 is not able to cross the outer membrane of *E. coli*, which is therefore resistant to the bactericidal activity of this peptide. However, the fused peptide EtpM-Ent35 is translocated to the inner membrane, producing membrane permeability and cell death, without the presence of its specific receptor. These results showed how class IIa bacteriocins need their receptor to reach the membrane and insert in to form the pore (Figure 5A).



**Figure 5.** Model of the mechanism of action and immunity for the class IIa bacteriocin, based on the suggestions from enterocin CRL35 [125]. **(A)** The bacteriocin reaches the membrane via interaction with EIIIC protein of maltose PTS transporter (EIIIC and EIID components). Then, the peptides organize themselves to form the pore. **(B)** The immunity protein (IP) is a soluble cytosolic protein, which interacts with the complex bacteriocin-receptor plugging the formed pore, avoiding cell death.

### 3.1.2. Immunity of Class IIa Bacteriocins

It is still unclear how the immune protein exerts its protective effect. As already mentioned, the immune protein acts from inside the cell and is not capable of interacting with the bacterial membrane by itself [12]. Nevertheless, somehow the immune protein must interact with the bacteriocin and/or its specific receptor. Diep et al. [122] demonstrated the formation of a strong tertiary complex involving a bacteriocin, the immune protein and the mannose PTS system. This complex was formed only when bacteriocin was present in the extracellular medium. Therefore, the bacteriocin–receptor interaction should occur for the coupling of the immunity protein, probably blocking the channel and thus preventing cell death. Recently, direct interaction of the immune protein with the specific receptor has been reported. Complementation assays with the immune protein PedB and the IICD

components of different species, showed the existence of a recognition specificity, so the receptor protein could influence the functionality of the immunity protein [126]. However, once again the use of the suicide probe EtpM-Ent35 concomitantly expressed with the gene *munC* showed that the immunity protein MunC was able to avoid the deleterious effect of the enterocin CRL35 without the presence of the specific receptor [125]. This result suggests the direct bacteriocin–immunity protein interaction, where the role of the immunity protein might be blocking the pore formed by the cognate bacteriocin (Figure 5B).

### 3.2. Class IIb Bacteriocins, or Two-Peptide Bacteriocins

These bacteriocins are composed of two different peptides (usually named  $\alpha$ - and  $\beta$ -peptide) which exhibit a high antimicrobial activity at pico- to nano-molar concentration, only when they are combined in equal ratio. In addition, the combination of one of the two peptides with the complementary peptide from another homologous bacteriocin can render a similar activity. This has been reported in lactococcin G, when one of the peptides was combined with the complementary peptide from lactococcin Q or enterocin 1071 [127].

All peptides from this bacteriocin class contain inside their helical domains at least one GxxxG-motif, except for plantaricin S $\beta$  and plantaricin NC8 $\beta$  which contain the GxxxG-like motifs AxxxA- and SxxxS-motif, respectively [127]. These motifs are known to mediate helix–helix interactions in membrane proteins [128].

#### 3.2.1. Mode of Action of Class IIb Bacteriocins

These bacteriocins act on the membranes of their targets by rendering them permeable to certain cations such as Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> or H<sup>+</sup>. This characteristic of mediating the transport of specific cations indicates that the bacteriocins form relatively sophisticated pores [127]. Furthermore, this membrane permeability is related to low concentrations of peptides, which is consistent with pore formation, but not with a detergent-like disruption of the membranes. The narrow spectrum of these bacteriocins has suggested the involvement of a receptor for their action, as described for pediocin-like bacteriocins. Recently, the undecaprenyl-pyrophosphate phosphatase, which is involved in peptidoglycan synthesis, has been described as the receptor for lactococcin G [129]. Furthermore, other membrane-associated proteins have been identified as the receptor for two-peptide bacteriocin such as plantaricin JK [130] and plantaricin EF [39].

#### 3.2.2. Immunity of Class IIb Bacteriocins

Regarding the immunity system, it has been described as being similar to those of pediocin-like bacteriocins, where there could be a direct interaction between the bacteriocin and the immunity protein, or an indirect interaction through its membrane receptor [127]. Nevertheless, little research has been done on these type of immunity proteins and their mode of action is unknown. LagC is the immunity protein for lactococcin G. Mutational studies revealed that LagC recognizes its own bacteriocin by the N-terminal part of lactococcin G $\alpha$  (residues 1 to 13) and the C-terminal part of lactococcin G $\beta$  (residues 14 to 24) [130]. In addition, it has been reported some degrees of cross-immunity between lactococcin G and its immunity protein LagC with the homologous enterocin 1071 [130], lactococcin Q [131] and their immunity proteins, EntI and LaqC, respectively. Moreover, it was observed that the protective activity of the LagC and EntI proteins depended on the composition of the target cell membranes, suggesting the interaction of these immunity proteins with their cognate bacteriocin receptors [130]. On the other hand, some immunity proteins such as SkkI, PlnI and PlnL, involved in self-protection against their cognate bacteriocins sakacin 23K, plantaricin EF and plantaricin JK, respectively, have shown homology to the Abi family of proteins, putative membrane-bound metalloproteases [132]. Thus, it has been suggested that these immunity proteins degrade their cognate bacteriocins by proteolysis.



All the immunity proteins for two-peptide bacteriocins have been described as membrane-associated proteins, containing at least one putative transmembrane domain. Recently, experimental procedures corroborated the membrane-associated nature of LagC and LciM, immunity proteins for lactococcin G and lactococcin MN, respectively [133]. Both proteins contain four transmembrane domains, but differ in orientation across the membrane, length and sequence. Additionally, CbnZ has also been identified as the immunity protein for carnobacteriocin XY. CbnZ contains only one transmembrane domain, and it is the smallest (42 amino acids) immunity protein described for this kind of bacteriocin up until now. Two-peptide bacteriocin immunity proteins are composed of proteins with a great structural variety [133].

### 3.3. Class IIc, Leaderless Bacteriocins

Bacteriocins are usually synthesized in an inactive form, with a leader peptide sequence that serves to guide it in its modification and secretion process. However, there is a group of bacteriocins that do not follow this scheme and do not undergo any translational modification and remarkably lack this leader sequence. These bacteriocins are thought to be synthesized in their active form, which raises questions about how the cell manages its own protection until the excretion of the peptide to the extracellular medium [97]. This group is very heterogeneous, especially regarding the number of peptides that compose the final bactericidal action, being able to be single-peptide, two-, three- or four-peptides bacteriocins. Much remains to be elucidated regarding the mechanism of action and the immune system of this group of bacteriocins.

#### 3.3.1. Mechanism of Action of Leaderless Bacteriocins

Regarding the mode of action, two mechanisms have been described. Lacticin Q binds to the target membranes by electrostatic interactions which provokes a rapid integration into the phospholipid bilayer. A large toroidal pore is formed leading to leakage of large intracellular components that causes cell death [134]. On the other hand, aureocin A53 has been shown to interact with the target membranes, leading to cell death, but without pore formation [135]. In addition, leaderless bacteriocin do not seem to require a receptor molecule to exert their antimicrobial effects. Nevertheless, the leaderless bacteriocin LsbB has been reported to interact with the zinc-dependent membrane metalloprotease YvjB [136].

#### 3.3.2. Immunity of Leaderless Bacteriocins

The immunity systems of this heterogeneous group of bacteriocins are poorly understood. In most cases, only possible candidate proteins that might be involved have been identified. In the case of aureocin A53, an ABC transporter has been demonstrated to be involved in self-protection, but for full immunity at least one more protein is necessary [137]. Two co-transcribed proteins, AucIA and AucIB, from *orf10-11* could be involved. A mutant carrying both proteins and the ABC transporter resulted in higher self-protection than the wild-type strain. The authors could not exclude either AucIA or AucIB from the involvement in immunity. Nevertheless, AucIA shares certain characteristics with other described immunity proteins, such as being a cationic protein and being associated to the membrane by three putative transmembrane regions [137]. In aureocin A70, a four-peptide leaderless bacteriocin, an ABC transporter was described that is involved in bacteriocin externalization but not in self-protection. The immunity is given by the AurI protein, that is AucIA for aureocin A53, which is a cationic transmembrane protein [138]. The well-known lacticin Q gene is adjacent to the structural gene in an operon of five genes, *orf3-7*, involved in transport and immunity [139]. Overexpression of the structural gene of lacticin Q in *L. lactis* NZ9000 caused an intracellular toxicity that was suppressed by the co-expression of the *orf3-7* genes. The decrease in toxicity is due to the secretion of the produced bacteriocin into the extracellular medium and by the presence of an auto-immunity

mechanism. Orf6-7 form a transporter for the bacteriocin, whereas Orf3-5 are all membrane proteins, of unknown function, that could be involved in the immunity process [139].

### 3.4. Class IId Bacteriocins, and Other Non-Pediocin-Like Single-Peptide Bacteriocins

Class IId consists of a group of heterogeneous bacteriocins whose main characteristic is that they are linear single-peptides that do not have motifs common to pediocin-like peptides. Examples include lactococcin A, lactococcin 972 and enterocin B [14].

Lactococcin A is a bacteriocin produced by *L. lactis* subsp. *cremoris* LMG 213 that has activity against strains that are phylogenetically close to the producing strain. It is produced as a 75 amino acid precursor with a 21 amino acid N-terminal extension. The genes involved in the biosynthesis of lactococcin A, including the structural gene (*lcnA*), the immunity gene (*lciA*) and two genes (*lcnC*, *lcnD*) that encode the dedicated ABC transport system and its accessory protein, are carried on a plasmid of about 55 kb [140].

*In vitro* experiments performed with purified lactococcin A showed that this bacteriocin could increase the permeability of the cytoplasmic membrane of the target cells by pore formation and also cause depolarization of the membrane potential. Similarly, it has been suggested that the specificity of lactococcin A may be mediated by a receptor protein associated with the cytoplasmic membrane [52]. Diep et al. [122] demonstrated that this specific receptor uses components of the mannose phosphotransferase system (man-PTS).

Some class IId bacteriocins have a mode of action other than pore formation. This is the case for lactococcin 972 (Lcn972), a bacteriocin produced by *L. lactis* IPLA972 that inhibits septum biosynthesis in the target strain by binding to the cell wall precursor, lipid II. Because it lacks any lanthionine ring or even cysteines that could form intramolecular bridges, it has been suggested that Lcn972 recognizes another motif in lipid II other than the pyrophosphate cage that is recognized by lantibiotics [141].

In order to protect itself against its own bacteriocin, the *L. lactis* strain produces an immunity protein called LciA possessing an  $\alpha$ -helix structure. Venema et al. [142] proposed a model of immunity mode of action in which the LciA immunity protein interacts with the man-PTS receptor of the *L. lactis* strain, thereby preventing pore formation by the bacteriocin.

## 4. Class III, “Wall Breaker” Bacteriocins

Class III includes all the thermolabile bacteriocins with a molecular weight above 10 kDa. Generally, they consist of several domains which can have different functions, such as translocation, receptor binding or lethal activity [14,45].

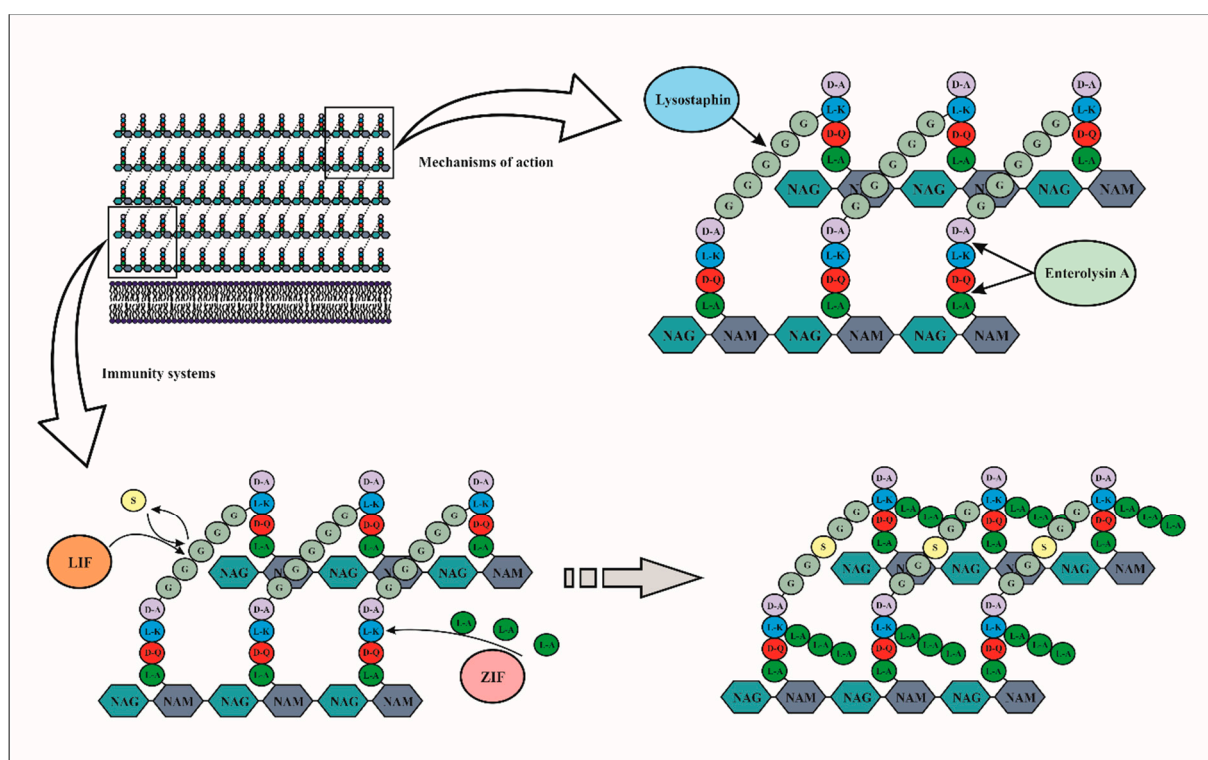
Enterolysin A is a class III bacteriocin produced by *E. faecalis* LMG 2333. It is active against *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* and *Lactobacillus* [143]. Of note, this bacteriocin is produced as a pre-protein of 343 amino acids with a 27 amino acid sec-dependent signal peptide, followed by a sequence corresponding to the N-terminal region of the mature protein. Sequence analysis of enterolysin A revealed the presence of two distinct domains, an N-terminal catalytic domain and a C-terminal substrate recognition domain. Moreover, the N-terminal region presents homologies with sequences of catalytic domains of different cell wall degradation proteins with a modular structure, such as ALE-1, and LytM which are both endopeptidases belonging to the M37 protease family [143,144].

### 4.1. Mode of Action of Class III Bacteriocins

Enterolysin A-like, lysostaphin, zoocin and millericin B are known to be endopeptidases that act at the bacterial cell wall level. As a reminder, the cell wall of Gram-positive bacteria is composed of alternate units of N-acetyl glucosamine (NAG) and N-acetyl muramic acid (NAM) linked by  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 bonds. The D-lactoyl group of each NAM residue is replaced with a peptide chain, containing most often L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala which is

called the stem peptide. Adjacent glycan strands are connected by cross-linking peptide chains between two peptide side chains. The lengths of these cross-linking chains, also called interpeptide bridges or cross-bridge, are very different between *Staphylococcus aureus* to *Enterococcus faecium* despite the similarities in other parts of peptidoglycan [145,146].

Depending on the nature of the lytic bacteriocin, the target may be either in the stem peptide, or in the interpeptide bridge, or both. Enterolysin A cleaves interpeptide bonds inside peptidoglycan units at two sites depending on the target strains. In *L. monocytogenes* NCTC 10884, *S. aureus* NCTC 4163 and *E. faecalis* No. 40, the cleavage occurs within the stem peptide between L-alanine and D-glutamic acid, whereas in *L. helveticus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *P. pentosaceus*, *L. lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* ssp. *cremoris* and *L. helveticus* strains the cleavage occurs between the L-lysine of the stem peptide and the D-aspartic acid of the interpeptide bridge. It was reported that when enterolysin A cleaved within the peptide bridge between L-alanine and D-glutamic acid, the antimicrobial activity observed was significantly higher (Figure 6) [147].



**Figure 6.** Mechanism of action and immunity of class III bacteriocins on the bacterial wall. These bacteriocins are endo-peptidases that act on the bacterial cell walls. Lysostaphin cleaves specifically between the third and fourth glycine residues of the pentaglycine cross-bridge, while Enterolysin A cleaves interpeptide bonds inside peptidoglycan units between L-alanine and D-glutamic acid. Regarding the immunity, the Lif and Zif proteins add or modify the cross-bridged amino acids during the synthesis of peptidoglycan subunits in the cytoplasm. Therefore, the Zif protein increases the proportion of cross-bridges containing three L-alanines, while the Lif proteins are involved in the substitution of glycine by serine.

The pentaglycine cross-bridge of the peptidoglycan represents the main target site of lysostaphin. For instance, in *S. aureus* and other staphylococcal species this bridge is constituted of five glycine (Gly) residues (Figure 6). Specifically, lysostaphin cleaves between the third and fourth glycine of the pentaglycine cross-bridge. It has been reported that the peptidoglycan of relatively lysostaphin-resistant staphylococcal species generally contains a greater amount of serine (Ser) than Gly [148].

However, some class III bacteriocins have a bacteriostatic instead of bactericidal mechanism of action, such as helveticin-M, a bacteriocin produced by *Lactobacillus crispatus*, which has an antimicrobial activity against *S. aureus*, *S. saprophyticus* and *Enterobacter*

*cloacae*. In fact, the increase in cell membrane permeability caused by helveticin does not influence cytosolic enzymes, thus indicating a sublethal lesion [149]. The mode of action differs according to the bacterial species. It was reported that helveticin-M could disrupt the cell wall of Gram-positive bacteria and disrupt the outer membrane of Gram-negative bacteria, thus modifying the surface structure. Similarly, in Gram-negative bacteria, it also disrupted the inner membrane, resulting in leakage of intracellular ATP from the cells and depolarization of the membrane potential of target bacteria [149].

#### 4.2. Immunity Mechanism of Class III Bacteriocins

Very few studies have been done on the auto-immunity of bacteriolysin producing strains to their own bacteriocin. Gargis et al. [150] studied the resistance to lysostaphin in *Staphylococcus simulans* biovar staphylolyticus. The lysostaphin resistance gene (*lif*) encodes a FemABX-like immunity protein, which is a non-ribosomal peptidyltransferase involved in the addition of cross-bridged amino acids during the synthesis of peptidoglycan subunits in the cytoplasm. In *S. simulans* bv. *staphylolyticus*, resistance to lysostaphin is due to the insertion of serines replacing certain glycines during peptidoglycan synthesis by the immunity protein. Indeed, it has been suggested that lysostaphin is unable to hydrolyze glycyl-serine or seryl-glycine bonds (Figure 6).

Other studies have shown that the immunity of producer cells to the bacteriocin zoocin A, a D-alanyl-L-alanine endopeptidase, was due to the presence of the zoocin A immunity factor (*Zif*), which also showed high degrees of similarity to members of the FemABX protein family (*MurM* and *MurN*). The authors reported that the presence of the *Zif* protein increased the proportion of crossbridges containing three l-alanines instead of two, resulting in reduced linkage of the recombinant target recognition domain of zoocin A to the peptidoglycan (Figure 6). In contrast to *Lif*, the *Zif* protein conferred resistance to zoocin A by lengthening the peptidoglycan cross-bridge rather than by causing an amino acid substitution [151].

Although there is a gene encoding an immunity protein in helveticin producing strains, the mechanism of immunity of these strains against their own bacteriocins has not been described [152,153].

### 5. Concluding Remarks and Future Prospects

LAB are known to produce many different antimicrobial substances such as bacteriocins, referred as LAB-bacteriocins. These molecules are of interest to the food industry, and can be used as biopreservative agents to replace chemical or heat treatments to produce foods with more natural preservatives, and rich in their organoleptic and nutritional properties [154]. Moreover, many LAB, particularly the genera *Lactococcus* and *Lactobacillus*, are considered safe to be used in animal feed and human food and health, and therefore they are included in the list of microorganisms with QPS (Qualified Presumption of Safety) status by the European Food Safety Authority (EFSA) in Europe [155]; or GRAS (Generally Recognized As Safe) status by the Food and Drug Administration (FDA) in the United States [156].

Accordingly, another application of LAB-bacteriocins could be in human medicine as an alternative to traditional antibiotics. The lack of discovery of new classes of antibiotics and the massive use of the traditional antibiotics has resulted in a worldwide antibiotic resistance issue. By 2050, it is predicted that antibiotic resistance will cause more than 10 million deaths per year, if no action is taken now. Apart from the cost in human lives, the financial cost of societal care will be more than USD 100 trillion worldwide [157]. Therefore, the use of LAB-bacteriocins in this context is completely justified. The majority of these molecules are safe [18] and also easy to be genetically modified in order to improve their activity. Advances in the chemical peptide synthesis and the availability of tools for expression of recombinant proteins will facilitate production of small bacteriocins with low post-translational modifications and extend their potential applications [158]. Moreover, bacteriocin-producing bacteria could be administrated to animals and humans

in order to produce *in situ* their bacteriocins along the microbiota and, in this way prevent or help to alleviate bacterial infections [159,160].

Sometimes, the association of bacteriocins with other molecules could improve their activities. Zgheib et al. [161] reported that the combination of bacteriocins with nanoparticles could enhance their stability, their solubility, protect them from enzymatic damage, reduce their interactions with other drugs and improve their biopreservation. The understanding of the immunity mechanism is also a major issue. Indeed, it is important to know how the immunity proteins ensure protection against their associated bacteriocins in the producing strain. This would allow on the one hand a better understanding of the modes of action of bacteriocins and on the other hand it would prevent the emergence of potential pathogenic bacteria and emergence of resistance to bacteriocins.

**Author Contributions:** A.P.-R., D.M.-M. and D.D. made the conceptualization of the work; D.D. has obtained the fundings; A.P.-R. and D.M.-M. wrote the original draft; D.D. has supervised the work; A.P.-R., D.M.-M., F.C. and D.D. have reviewed and edited the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Acknowledgments:** The authors are grateful to Yanath Belguesmia and Stephen W Elson for the critical reading of the manuscript and the English improvement of this manuscript. We also acknowledge the Hauts-de-France region, through ALIBIOTECH CPER/FEDER 2016/2021, Université de Lille.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Drider, D.; Rebuffat, S. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*; Springer Science & Business Media, New York, NY, USA; 2011; ISBN 978-1-4419-7692-5.
2. Meade, E.; Slattery, M.A.; Garvey, M. Bacteriocins, Potent Antimicrobial Peptides and the Fight against Multi Drug Resistant Species: Resistance Is Futile? *Antibiotics* **2020**, *9*, 32, doi:10.3390/antibiotics9010032.
3. Settanni, L.; Corsetti, A. Application of Bacteriocins in Vegetable Food Biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *121*, 123–138, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.09.001.
4. Siroli, L.; Camprini, L.; Pisano, M.B.; Patrignani, F.; Lanciotti, R. Volatile Molecule Profiles and Anti-Listeria Monocytogenes Activity of Nisin Producers Lactococcus Lactis Strains in Vegetable Drinks. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 563, doi:10.3389/fmicb.2019.00563.
5. 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.; Seal, B.S. 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.* **2006**, *50*, 3111–3116, doi:10.1128/AAC.00259-06.
6. Messaoudi, S.; Kergourlay, G.; Dalgalarroondo, M.; Choiset, Y.; Ferchichi, M.; Prévost, H.; Pilet, M.-F.; Chobert, J.-M.; Manai, M.; Dousset, X. Purification and Characterization of a New Bacteriocin Active against Campylobacter Produced by Lactobacillus Salivarius SMXD51. *Food Microbiol.* **2012**, *32*, 129–134, doi:10.1016/j.fm.2012.05.002.
7. Belguesmia, Y.; Bendjeddou, K.; Kempf, I.; Boukherroub, R.; Drider, D. Heterologous Biosynthesis of Five New Class II Bacteriocins from Lactobacillus Paracasei CNCM I-5369 with Antagonistic Activity against Pathogenic Escherichia Coli Strains. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 1198, doi:10.3389/fmicb.2020.01198.
8. Liu, Y.-Y.; Wang, Y.; Walsh, T.R.; Yi, L.-X.; Zhang, R.; Spencer, J.; Doi, Y.; Tian, G.; Dong, B.; Huang, X.; et al. Emergence of Plasmid-Mediated Colistin Resistance Mechanism MCR-1 in Animals and Human Beings in China: A Microbiological and Molecular Biological Study. *Lancet Infect. Dis.* **2016**, *16*, 161–168, doi:10.1016/S1473-3099(15)00424-7.
9. Drider, D.; Bendali, F.; Naghmouchi, K.; Chikindas, M.L. Bacteriocins: Not Only Antibacterial Agents. *Probiotics Antimicro. Prot.* **2016**, *8*, 177–182, doi:10.1007/s12602-016-9223-0.
10. Chikindas, M.L.; Weeks, R.; Drider, D.; Chistyakov, V.A.; Dicks, L.M.T. Functions and Emerging Applications of Bacteriocins. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2018**, *49*, 23–28, doi:10.1016/j.copbio.2017.07.011.
11. Klaenhammer, T.R. Genetics of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **1993**, *12*, 39–85, doi:10.1111/j.1574-6976.1993.tb00012.x.

12. Drider, D.; Fimland, G.; Hechard, Y.; McMullen, L.M.; Prevost, H. The Continuing Story of Class IIa Bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2006**, *70*, 564–582, doi:10.1128/MMBR.00016-05.
13. Heng, N.C.K.; Tagg, J.R. What's in a Name? Class Distinction for Bacteriocins. *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, *4*, 160–160, doi:10.1038/nrmicro1273-c1.
14. Alvarez-Sieiro, P.; Montalbán-López, M.; Mu, D.; Kuipers, O.P. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Extending the Family. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 2939–2951, doi:10.1007/s00253-016-7343-9.
15. Dicks, L.M.T.; Dreyer, L.; Smith, C.; van Staden, A.D. A Review: The Fate of Bacteriocins in the Human Gastro-Intestinal Tract: Do They Cross the Gut–Blood Barrier? *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2297, doi:10.3389/fmicb.2018.02297.
16. Soltani, S.; Hammami, R.; Cotter, P.D.; Rebuffat, S.; Said, L.B.; Gaudreau, H.; Bédard, F.; Biron, E.; Drider, D.; Fliss, I. Bacteriocins as a New Generation of Antimicrobials: Toxicity Aspects and Regulations. *FEMS Microbiol. Rev.* **2021**, *45*, fuaa039, doi:10.1093/femsre/fuaa039.
17. Rebuffat, S. Bacteriocins from Gram-negative bacteria: A classification? In *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*; Drider, D., Rebuffat, S., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2011; pp. 55–72, ISBN 978-1-4419-7692-5.
18. Perez, R.H.; Zendo, T.; Sonomoto, K. Novel Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria (LAB): Various Structures and Applications. *Microb. Cell Fact.* **2014**, *13* (Suppl 1), S3, doi:10.1186/1475-2859-13-S1-S3.
19. Juturu, V.; Wu, J.C. Microbial Production of Bacteriocins: Latest Research Development and Applications. *Biotechnol. Adv.* **2018**, *36*, 2187–2200, doi:10.1016/j.biotechadv.2018.10.007.
20. Daba, H.; Pandian, S.; Gosselin, J.F.; Simard, R.E.; Huang, J.; Lacroix, C. Detection and Activity of a Bacteriocin Produced by *Leuconostoc Mesenteroides*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, *57*, 3450–3455.
21. Hahn-Löbmann, S.; Stephan, A.; Schulz, S.; Schneider, T.; Shaverskyi, A.; Tusé, D.; Giritch, A.; Gleba, Y. Colicins and Salmocins—New Classes of Plant-Made Non-Antibiotic Food Antibacterials. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 437, doi:10.3389/fpls.2019.00437.
22. Shin, J.M.; Gwak, J.W.; Kamarajan, P.; Fenno, J.C.; Rickard, A.H.; Kapila, Y.L. Biomedical Applications of Nisin. *J. Appl. Microbiol.* **2016**, *120*, 1449–1465, doi:10.1111/jam.13033.
23. Masdea, L.; Kulik, E.M.; Hauser-Gerspach, I.; Ramseier, A.M.; Filippi, A.; Waltimo, T. Antimicrobial Activity of *Streptococcus Salivarius* K12 on Bacteria Involved in Oral Malodour. *Arch. Oral Biol.* **2012**, *57*, 1041–1047, doi:10.1016/j.archoralbio.2012.02.011.
24. Wescombe, P.A.; Hale, J.D.F.; Heng, N.C.K.; Tagg, J.R. Developing Oral Probiotics from *Streptococcus Salivarius*. *Future Microbiol.* **2012**, *7*, 1355–1371, doi:10.2217/fmb.12.113.
25. Srinivas, S.; Paul, D.C.; Colin, H. Lacticin 3147—Biosynthesis, Molecular Analysis, Immunity, Bioengineering and Applications. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2012**, *13*, 193–204.
26. Kitching, M.; Mathur, H.; Flynn, J.; Byrne, N.; Dillon, P.; Sayers, R.; Rea, M.C.; Hill, C.; Ross, R.P. A Live Bio-Therapeutic for Mastitis, Containing *Lactococcus Lactis* DPC3147 with Comparable Efficacy to Antibiotic Treatment. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2220, doi:10.3389/fmicb.2019.02220.
27. Sánchez-Hidalgo, M.; Montalbán-López, M.; Cebrián, R.; Valdivia, E.; Martínez-Bueno, M.; Maqueda, M. AS-48 Bacteriocin: Close to Perfection. *Cell. Mol. Life Sci.* **2011**, *68*, 2845–2857, doi:10.1007/s00018-011-0724-4.
28. Montalbán-López, M.; Cebrián, R.; Galera, R.; Mingorance, L.; Martín-Platero, A.M.; Valdivia, E.; Martínez-Bueno, M.; Maqueda, M. Synergy of the Bacteriocin AS-48 and Antibiotics against Uropathogenic Enterococci. *Antibiotics* **2020**, *9*, 567, doi:10.3390/antibiotics9090567.
29. Rodríguez, J.M.; Martínez, M.I.; Kok, J. Pediocin PA-1, a Wide-Spectrum Bacteriocin from Lactic Acid Bacteria. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2002**, *42*, 91–121, doi:10.1080/10408690290825475.
30. Araújo, C.; Muñoz-Atienza, E.; Poeta, P.; Igrejas, G.; Hernández, P.E.; Herranz, C.; Cintas, L.M. Characterization of *Pediococcus Acidilactici* Strains Isolated from Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Feed and Larvae: Safety, DNA Fingerprinting, and Bacteriocinogenicity. *Dis. Aquat. Organ.* **2016**, *119*, 129–143, doi:10.3354/dao02992.
31. Todorov, S.D.; Dicks, L.M.T. *Lactobacillus Plantarum* Isolated from Molasses Produces Bacteriocins Active against Gram-Negative Bacteria. *Enzyme Microb. Technol.* **2005**, *36*, 318–326, doi:10.1016/j.enzmictec.2004.09.009.
32. Knoetze, H.; Todorov, S.D.; Dicks, L.M.T. A Class IIa Peptide from *Enterococcus Mundtii* Inhibits Bacteria Associated with Otitis Media. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2008**, *31*, 228–234, doi:10.1016/j.ijantimicag.2007.10.010.
33. Saeed, S.; Rasool, S.A.; Ahmad, S.; Zaidi, S.; Rehmani, S. Antiviral Activity of Staphylococin 188: A Purified Bacteriocin like Inhibitory Substance Isolated from *Staphylococcus Aureus* AB188. *Res. J. Microbiol.* **2007**, *2*, 796–806.
34. Navarro, S.A.; Lanza, L.; Acuña, L.; Bellomio, A.; Chalón, M.C. Features and Applications of Ent35-MccV Hybrid Bacteriocin: Current State and Perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104*, 6067–6077, doi:10.1007/s00253-020-10650-8.

35. Todorov, S.D.; Wachsmann, M.; Tomé, E.; Dousset, X.; Destro, M.T.; Dicks, L.M.T.; de Melo Franco, B.D.G.; Vaz-Velho, M.; Drider, D. Characterisation of an Antiviral Pediocin-like Bacteriocin Produced by *Enterococcus Faecium*. *Food Microbiol.* **2010**, *27*, 869–879, doi:10.1016/j.fm.2010.05.001.
36. Kaur, B.; Balgir, P.P.; Mittu, B.; Kumar, B.; Garg, N. Biomedical Applications of Fermenticin HV6b Isolated from *Lactobacillus Fermentum* HV6b MTCC10770. *Biomed. Res. Int.* **2013**, *2013*, e168438, doi:10.1155/2013/168438.
37. Villarante, K.I.; Elegado, F.B.; Iwatani, S.; Zendo, T.; Sonomoto, K.; de Guzman, E.E. Purification, Characterization and in Vitro Cytotoxicity of the Bacteriocin from *Pediococcus Acidilactici* K2a2-3 against Human Colon Adenocarcinoma (HT29) and Human Cervical Carcinoma (HeLa) Cells. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *27*, 975–980, doi:10.1007/s11274-010-0541-1.
38. Belguesmia, Y.; Choiset, Y.; Rabesona, H.; Baudy-Floc'h, M.; Blay, G.L.; Haertlé, T.; Chobert, J.-M. Antifungal Properties of Durancins Isolated from *Enterococcus Durans* A5-11 and of Its Synthetic Fragments. *Letts. Appl. Microbiol.* **2013**, *56*, 237–244, doi:10.1111/lam.12037.
39. Heeney, D.D.; Yarov-Yarovoy, V.; Marco, M.L. Sensitivity to the Two Peptide Bacteriocin Plantaricin EF Is Dependent on CorC, a Membrane-Bound, Magnesium/Cobalt Efflux Protein. *MicrobiologyOpen* **2019**, *8*, e827, doi:10.1002/mbo3.827.
40. Kadouri, D.E.; To, K.; Shanks, R.M.Q.; Doi, Y. Predatory Bacteria: A Potential Ally against Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e63397, doi:10.1371/journal.pone.0063397.
41. Kang, B.S.; Seo, J.-G.; Lee, G.-S.; Kim, J.-H.; Kim, S.Y.; Han, Y.W.; Kang, H.; Kim, H.O.; Rhee, J.H.; Chung, M.-J.; et al. Antimicrobial Activity of Enterocins from *Enterococcus Faecalis* SL-5 against *Propionibacterium Acnes*, the Causative Agent in *Acne Vulgaris*, and Its Therapeutic Effect. *J. Microbiol.* **2009**, *47*, 101–109, doi:10.1007/s12275-008-0179-y.
42. Jayakumar, J.; Kumar, V.A.; Biswas, L.; Biswas, R. Therapeutic Applications of Lysostaphin against *Staphylococcus Aureus*. *J. Appl. Microbiol.* **2020**, *131*, 1072–1082, doi:10.1111/jam.14985.
43. Ye, G.; Huang, J.; Li, G.; Zhang, J.; Sun, Y.; Zeng, D.; Bao, W.; Zhong, J.; Huang, Q. Clinical Efficacy of Intravaginal Recombinant Lysostaphin Administration on Endometritis in Sows. *Vet. Med. Sci.* **2021**, *7*, 746–754, doi:10.1002/vms3.417.
44. McAuliffe, O.; Ross, R.P.; Hill, C. Lantibiotics: Structure, Biosynthesis and Mode of Action. *FEMS Microbiol. Rev.* **2001**, *25*, 285–308, doi:10.1111/j.1574-6976.2001.tb00579.x.
45. Cotter, P.D.; Hill, C.; Ross, R.P. Bacteriocins: Developing Innate Immunity for Food. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 777–788, doi:10.1038/nrmicro1273.
46. Li, Y.; Rebuffat, S. The Manifold Roles of Microbial Ribosomal Peptide-Based Natural Products in Physiology and Ecology. *J. Biol. Chem.* **2020**, *295*, 34–54, doi:10.1074/jbc.REV119.006545.
47. Willey, J.M.; van der Donk, W.A. Lantibiotics: Peptides of Diverse Structure and Function. *Annu. Rev. Microbiol.* **2007**, *61*, 477–501, doi:10.1146/annurev.micro.61.080706.093501.
48. Daly, K.M.; Cotter, P.D.; Hill, C.; Ross, R.P. Lantibiotic Production by Pathogenic Microorganisms. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2012**, *13*, 509–523, doi:10.2174/138920312803582997.
49. Wilson-Stanford, S.; Smith, L. Commercial Development and Application of Type a Lantibiotics. *Recent Pat. Anti-Infect. Drug Discov.* **2011**, *6*, 175–185, doi:10.2174/157489111796064632.
50. van Kraaij, C.; Breukink, E.; Noordermeer, M.A.; Demel, R.A.; Siezen, R.J.; Kuipers, O.P.; de Kruijff, B. Pore Formation by Nisin Involves Translocation of Its C-Terminal Part across the Membrane. *Biochemistry* **1998**, *37*, 16033–16040, doi:10.1021/bi980931b.
51. Wiedemann, I.; Breukink, E.; van Kraaij, C.; Kuipers, O.P.; Bierbaum, G.; de Kruijff, B.; Sahl, H.G. 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.* **2001**, *276*, 1772–1779, doi:10.1074/jbc.M006770200.
52. van Belkum, M.J.; Kok, J.; Venema, G.; Holo, H.; Nes, I.F.; Konings, W.N.; Abee, T. The Bacteriocin Lactococcin a Specifically Increases Permeability of Lactococcal Cytoplasmic Membranes in a Voltage-Independent, Protein-Mediated Manner. *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 7934–7941, doi:10.1128/jb.173.24.7934-7941.1991.
53. Montville, T.J.; Bruno, M.E. Evidence That Dissipation of Proton Motive Force Is a Common Mechanism of Action for Bacteriocins and Other Antimicrobial Proteins. *Int. J. Food Microbiol.* **1994**, *24*, 53–74, doi:10.1016/0168-1605(94)90106-6.
54. Farha, M.A.; Verschoor, C.P.; Bowdish, D.; Brown, E.D. Collapsing the Proton Motive Force to Identify Synergistic Combinations against *Staphylococcus Aureus*. *Chem. Biol.* **2013**, *20*, 1168–1178, doi:10.1016/j.chembiol.2013.07.006.
55. Kordel, M.; Schüller, F.; Sahl, H.G. Interaction of the Pore Forming-Peptide Antibiotics Pep 5, Nisin and Subtilin with Non-Energized Liposomes. *FEBS Lett.* **1989**, *244*, 99–102, doi:10.1016/0014-5793(89)81171-8.
56. Moll, G.N.; Roberts, G.C.K.; Konings, W.N.; Driessen, A.J.M. Mechanism of Lantibiotic-Induced Pore-Formation. *Antonie Leeuwenhoek* **1996**, *69*, 185–191, doi:10.1007/BF00399423.
57. McLaughlin, R.E.; Ferretti, J.J.; Hynes, W.L. Nucleotide Sequence of the Streptococcal A-FF22 Lantibiotic Regulon: Model for Production of the Lantibiotic SA-FF22 by Strains of *Streptococcus Pyogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* **1999**, *175*, 171–177, doi:10.1111/j.1574-6968.1999.tb13616.x.

58. Breukink, E.; Ganz, P.; de Kruijff, B.; Seelig, J. Binding of Nisin Z to Bilayer Vesicles as Determined with Isothermal Titration Calorimetry. *Biochemistry* **2000**, *39*, 10247–10254, doi:10.1021/bi000915q.
59. Giffard, C.J.; Dodd, H.M.; Horn, N.; Ladha, S.; Mackie, A.R.; Parr, A.; Gasson, M.J.; Sanders, D. Structure-Function Relations of Variant and Fragment Nisins Studied with Model Membrane Systems. *Biochemistry* **1997**, *36*, 3802–3810, doi:10.1021/bi962506t.
60. Héchard, Y.; Sahl, H.-G. Mode of Action of Modified and Unmodified Bacteriocins from Gram-Positive Bacteria. *Biochimie* **2002**, *84*, 545–557, doi:10.1016/S0300-9084(02)01417-7.
61. Driessen, A.J.; van den Hooven, H.W.; Kuiper, W.; van de Kamp, M.; Sahl, H.G.; Konings, R.N.; Konings, W.N. Mechanistic Studies of Lantibiotic-Induced Permeabilization of Phospholipid Vesicles. *Biochemistry* **1995**, *34*, 1606–1614, doi:10.1021/bi00005a017.
62. Tolpekina, T.V.; den Otter, W.K.; Briels, W.J. Nucleation Free Energy of Pore Formation in an Amphiphilic Bilayer Studied by Molecular Dynamics Simulations. *J. Chem. Phys.* **2004**, *121*, 12060–12066, doi:10.1063/1.1815296.
63. Sahl, H.G.; Kordel, M.; Benz, R. Voltage-Dependent Depolarization of Bacterial Membranes and Artificial Lipid Bilayers by the Peptide Antibiotic Nisin. *Arch. Microbiol.* **1987**, *149*, 120–124, doi:10.1007/BF00425076.
64. Garcerá, M.J.; Elferink, M.G.; Driessen, A.J.; Konings, W.N. In Vitro Pore-Forming Activity of the Lantibiotic Nisin. Role of Protonmotive Force and Lipid Composition. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *212*, 417–422, doi:10.1111/j.1432-1033.1993.tb17677.x.
65. Breukink, E.; van Heusden, H.E.; Vollmerhaus, P.J.; Swiezewska, E.; Brunner, L.; Walker, S.; Heck, A.J.R.; de Kruijff, B. Lipid II Is an Intrinsic Component of the Pore Induced by Nisin in Bacterial Membranes. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 19898–19903, doi:10.1074/jbc.M301463200.
66. van Heusden, H.E.; de Kruijff, B.; Breukink, E. Lipid II Induces a Transmembrane Orientation of the Pore-Forming Peptide Lantibiotic Nisin. *Biochemistry* **2002**, *41*, 12171–12178, doi:10.1021/bi026090x.
67. Breukink, E.; Wiedemann, I.; van Kraaij, C.; Kuipers, O.P.; Sahl, H.G.; de Kruijff, B. Use of the Cell Wall Precursor Lipid II by a Pore-Forming Peptide Antibiotic. *Science* **1999**, *286*, 2361–2364, doi:10.1126/science.286.5448.2361.
68. Hsu, S.-T.D.; Breukink, E.; Tischenko, E.; Lutters, M.A.G.; de Kruijff, B.; Kaptein, R.; Bonvin, A.M.J.J.; van Nuland, N.A.J. The Nisin–Lipid II Complex Reveals a Pyrophosphate Cage That Provides a Blueprint for Novel Antibiotics. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 963–967, doi:10.1038/nsmb830.
69. Wiedemann, I.; Benz, R.; Sahl, H.-G. Lipid II-Mediated Pore Formation by the Peptide Antibiotic Nisin: A Black Lipid Membrane Study. *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 3259–3261, doi:10.1128/jb.186.10.3259-3261.2004.
70. Hasper, H.E.; Kramer, N.E.; Smith, J.L.; Hillman, J.D.; Zachariah, C.; Kuipers, O.P.; de Kruijff, B.; Breukink, E. An Alternative Bactericidal Mechanism of Action for Lantibiotic Peptides That Target Lipid II. *Science* **2006**, *313*, 1636–1637, doi:10.1126/science.1129818.
71. Brötz, H.; Bierbaum, G.; Leopold, K.; Reynolds, P.E.; Sahl, H.G. The Lantibiotic Mersacidin Inhibits Peptidoglycan Synthesis by Targeting Lipid II. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 154–160, doi:10.1128/AAC.42.1.154.
72. Dickman, R.; Mitchell, S.A.; Figueiredo, A.M.; Hansen, D.F.; Tabor, A.B. Molecular Recognition of Lipid II by Lantibiotics: Synthesis and Conformational Studies of Analogues of Nisin and Mutacin Rings A and B. *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 11493–11512, doi:10.1021/acs.joc.9b01253.
73. Zimmermann, N.; Metzger, J.W.; Jung, G. The Tetracyclic Lantibiotic Actagardine. <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR Assignments and Revised Primary Structure. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *228*, 786–797.
74. Bierbaum, G.; Sahl, H.G. Autolytic System of Staphylococcus Simulans 22: Influence of Cationic Peptides on Activity of N-Acetylmuramoyl-L-Alanine Amidase. *J. Bacteriol.* **1987**, *169*, 5452–5458, doi:10.1128/jb.169.12.5452-5458.1987.
75. Liu, W.; Hansen, J.N. The Antimicrobial Effect of a Structural Variant of Subtilin against Outgrowing Bacillus Cereus T Spores and Vegetative Cells Occurs by Different Mechanisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59*, 648–651, doi:10.1128/AEM.59.2.648-651.1993.
76. Barbour, A.; Wescombe, P.; Smith, L. Evolution of Lantibiotic Salivaricins: New Weapons to Fight Infectious Diseases. *Trends Microbiol.* **2020**, *28*, 578–593, doi:10.1016/j.tim.2020.03.001.
77. Draper, L.A.; Ross, R.P.; Hill, C.; Cotter, P.D. Lantibiotic Immunity. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2008**, *9*, 39–49, doi:10.2174/138920308783565750.
78. Hacker, C.; Christ, N.A.; Duchardt-Ferner, E.; Korn, S.; Göbl, C.; Berninger, L.; Düsterhus, S.; Hellmich, U.A.; Madl, T.; Kötter, P.; et al. The Solution Structure of the Lantibiotic Immunity Protein NisI and Its Interactions with Nisin. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 28869–28886, doi:10.1074/jbc.M115.679969.
79. Stein, T.; Heinzmann, S.; Solovieva, I.; Entian, K.-D. Function of Lactococcus Lactis Nisin Immunity Genes NisI and NisFEG after Coordinated Expression in the Surrogate Host Bacillus Subtilis. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 89–94, doi:10.1074/jbc.M207237200.
80. Bierbaum, G.; Sahl, H.-G. Lantibiotics: Mode of Action, Biosynthesis and Bioengineering. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2009**, *10*, 2–18, doi:10.2174/138920109787048616.



81. Ra, R.; Beerthuyzen, M.M.; de Vos, W.M.; Saris, P.E.J.; Kuipers, O.P. Effects of Gene Disruptions in the Nisin Gene Cluster of *Lactococcus Lactis* on Nisin Production and Producer Immunity. *Microbiology (Reading)* **1999**, *145 Pt 5*, 1227–1233, doi:10.1099/13500872-145-5-1227.
82. Siegers, K.; Entian, K.D. Genes Involved in Immunity to the Lantibiotic Nisin Produced by *Lactococcus Lactis* 6F3. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 1082–1089.
83. Koponen, O.; Takala, T.M.; Saarela, U.; Qiao, M.; Saris, P.E.J. Distribution of the NisI Immunity Protein and Enhancement of Nisin Activity by the Lipid-Free NisI. *FEMS Microbiol. Lett.* **2004**, *231*, 85–90, doi:10.1016/S0378-1097(03)00934-0.
84. Alkhatib, Z.; Lagedroste, M.; Zäschke, J.; Wagner, M.; Abts, A.; Fey, I.; Kleinschrodt, D.; Smits, S.H.J. The C-Terminus of Nisin Is Important for the ABC Transporter NisFEG to Confer Immunity in *Lactococcus Lactis*. *MicrobiologyOpen* **2014**, *3*, 752–763, doi:10.1002/mbo3.205.
85. Zhu, D.; Li, R.; Liu, F.; Xu, H.; Li, B.; Yuan, Y.; Saris, P.E.J.; Qiao, M. Mu Insertion in *FeuD* Triggers the Increase in Nisin Immunity in *Lactococcus Lactis* Subsp. *Lactis* N8. *J. Appl. Microbiol.* **2016**, *120*, 402–412, doi:10.1111/jam.13015.
86. Siezen, R.J.; Bayjanov, J.; Renckens, B.; Wels, M.; van Hijum, S.A.F.T.; Molenaar, D.; van Hylckama Vlieg, J.E.T. Complete Genome Sequence of *Lactococcus Lactis* Subsp. *Lactis* KF147, a Plant-Associated Lactic Acid Bacterium. *J. Bacteriol.* **2010**, *192*, 2649–2650, doi:10.1128/JB.00276-10.
87. Halami, P.M.; Stein, T.; Chandrashekar, A.; Entian, K.-D. Maturation and Processing of SpaI, the Lipoprotein Involved in Subtilin Immunity in *Bacillus Subtilis* ATCC 6633. *Microbiol. Res.* **2010**, *165*, 183–189, doi:10.1016/j.micres.2009.02.001.
88. Geiger, C.; Korn, S.M.; Häsler, M.; Peetz, O.; Martin, J.; Kötter, P.; Morgner, N.; Entian, K.-D. LanI-Mediated Lantibiotic Immunity in *Bacillus Subtilis*: Functional Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **2019**, *85*, e00534-19, doi:10.1128/AEM.00534-19.
89. Christ, N.A.; Bochmann, S.; Gottstein, D.; Duchardt-Ferner, E.; Hellmich, U.A.; Düsterhus, S.; Kötter, P.; Güntert, P.; Entian, K.-D.; Wöhnert, J. The First Structure of a Lantibiotic Immunity Protein, SpaI from *Bacillus Subtilis*, Reveals a Novel Fold. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 35286–35298, doi:10.1074/jbc.M112.401620.
90. Khosa, S.; Lagedroste, M.; Smits, S.H.J. Protein Defense Systems against the Lantibiotic Nisin: Function of the Immunity Protein NisI and the Resistance Protein NSR. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 504, doi:10.3389/fmicb.2016.00504.
91. Jeong, J.H.; Ha, S.C. Crystal Structure of NisI in a Lipid-Free Form, the Nisin Immunity Protein, from *Lactococcus Lactis*. *Anti-microb. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e01966-17, doi:10.1128/AAC.01966-17.
92. Hoffmann, A.; Schneider, T.; Pag, U.; Sahl, H.-G. Localization and Functional Analysis of PepI, the Immunity Peptide of Pep5-Producing *Staphylococcus Epidermidis* Strain 5. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 3263–3271, doi:10.1128/AEM.70.6.3263-3271.2004.
93. van Belkum, M.J.; Martin-Visscher, L.A.; Vederas, J.C. Structure and Genetics of Circular Bacteriocins. *Trends Microbiol.* **2011**, *19*, 411–418, doi:10.1016/j.tim.2011.04.004.
94. Maqueda, M.; Gálvez, A.; Bueno, M.M.; Sanchez-Barrena, M.J.; González, C.; Albert, A.; Rico, M.; Valdivia, E. Peptide AS-48: Prototype of a New Class of Cyclic Bacteriocins. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2004**, *5*, 399–416, doi:10.2174/1389203043379567.
95. Maqueda, M.; Sánchez-Hidalgo, M.; Fernández, M.; Montalbán-López, M.; Valdivia, E.; Martínez-Bueno, M. Genetic Features of Circular Bacteriocins Produced by Gram-Positive Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32*, 2–22, doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00087.x.
96. Gabrielsen, C.; Brede, D.A.; Nes, I.F.; Diep, D.B. Circular Bacteriocins: Biosynthesis and Mode of Action. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 6854–6862, doi:10.1128/AEM.02284-14.
97. Perez, R.H.; Zendo, T.; Sonomoto, K. Circular and Leaderless Bacteriocins: Biosynthesis, Mode of Action, Applications, and Prospects. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2085, doi:10.3389/fmicb.2018.02085.
98. Gálvez, A.; Maqueda, M.; Valdivia, E.; Quesada, A.; Montoya, E. Characterization and Partial Purification of a Broad Spectrum Antibiotic AS-48 Produced by *Streptococcus Faecalis*. *Can. J. Microbiol.* **1986**, *32*, 765–771, doi:10.1139/m86-141.
99. Sánchez-Barrena, M.J.; Martínez-Ripoll, M.; Gálvez, A.; Valdivia, E.; Maqueda, M.; Cruz, V.; Albert, A. Structure of Bacteriocin AS-48: From Soluble State to Membrane Bound State. *J. Mol. Biol.* **2003**, *334*, 541–549, doi:10.1016/j.jmb.2003.09.060.
100. Cebrián, R.; Martínez-Bueno, M.; Valdivia, E.; Albert, A.; Maqueda, M.; Sánchez-Barrena, M.J. The Bacteriocin AS-48 Requires Dimer Dissociation Followed by Hydrophobic Interactions with the Membrane for Antibacterial Activity. *J. Struct. Biol.* **2015**, *190*, 162–172, doi:10.1016/j.jsb.2015.03.006.
101. Gálvez, A.; Maqueda, M.; Martínez-Bueno, M.; Valdivia, E. Permeation of Bacterial Cells, Permeation of Cytoplasmic and Artificial Membrane Vesicles, and Channel Formation on Lipid Bilayers by Peptide Antibiotic AS-48. *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 886–892, doi:10.1128/jb.173.2.886-892.1991.
102. Cruz, V.L.; Ramos, J.; Melo, M.N.; Martínez-Salazar, J. Bacteriocin AS-48 Binding to Model Membranes and Pore Formation as Revealed by Coarse-Grained Simulations. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2013**, *1828*, 2524–2531, doi:10.1016/j.bbmem.2013.05.036.

103. Gabrielsen, C.; Brede, D.A.; Hernández, P.E.; Nes, I.F.; Diep, D.B. The Maltose ABC Transporter in *Lactococcus Lactis* Facilitates High-Level Sensitivity to the Circular Bacteriocin Garvicin ML. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 2908–2915, doi:10.1128/AAC.00314-12.
104. Gor, M.-C.; Vezina, B.; McMahon, R.M.; King, G.J.; Panjikar, S.; Rehm, B.H.A.; Martin, J.L.; Smith, A.T. Crystal Structure and Site-Directed Mutagenesis of Circular Bacteriocin Plantacyclin B21AG Reveals Cationic and Aromatic Residues Important for Antimicrobial Activity. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 17398, doi:10.1038/s41598-020-74332-1.
105. Martínez-Bueno, M.; Maqueda, M.; Gálvez, A.; Samyn, B.; Van Beeumen, J.; Coyette, J.; Valdivia, E. Determination of the Gene Sequence and the Molecular Structure of the Enterococcal Peptide Antibiotic AS-48. *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 6334–6339, doi:10.1128/jb.176.20.6334-6339.1994.
106. Diaz, M.; Valdivia, E.; Martínez-Bueno, M.; Fernández, M.; Soler-González, A.S.; Ramírez-Rodrigo, H.; Maqueda, M. Characterization of a New Operon, as-48EFGH, from the as-48 Gene Cluster Involved in Immunity to Enterocin AS-48. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 1229–1236, doi:10.1128/AEM.69.2.1229-1236.2003.
107. Cebrián, R.; Rodríguez-Ruano, S.; Martínez-Bueno, M.; Valdivia, E.; Maqueda, M.; Montalbán-López, M. Analysis of the Promoters Involved in Enterocin AS-48 Expression. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e90603, doi:10.1371/journal.pone.0090603.
108. Martínez-Bueno, M.; Valdivia, E.; Gálvez, A.; Coyette, J.; Maqueda, M. Analysis of the Gene Cluster Involved in Production and Immunity of the Peptide Antibiotic AS-48 in *Enterococcus Faecalis*. *Mol. Microbiol.* **1998**, *27*, 347–358, doi:10.1046/j.1365-2958.1998.00682.x.
109. Fernández, M.; Sánchez-Hidalgo, M.; García-Quintáns, N.; Martínez-Bueno, M.; Valdivia, E.; López, P.; Maqueda, M. Processing of As-48ABC RNA in AS-48 Enterocin Production by *Enterococcus Faecalis*. *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 240–250, doi:10.1128/JB.01528-07.
110. Kemperman, R.; Jonker, M.; Nauta, A.; Kuipers, O.P.; Kok, J. Functional Analysis of the Gene Cluster Involved in Production of the Bacteriocin Circularin A by *Clostridium Beijerinckii* ATCC 25752. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 5839–5848, doi:10.1128/AEM.69.10.5839-5848.2003.
111. van Belkum, M.J.; Martin-Visscher, L.A.; Vederas, J.C. Cloning and Characterization of the Gene Cluster Involved in the Production of the Circular Bacteriocin Barnocyclin A. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2010**, *2*, 218–225, doi:10.1007/s12602-010-9056-1.
112. Borrero, J.; Brede, D.A.; Skaugen, M.; Diep, D.B.; Herranz, C.; Nes, I.F.; Cintas, L.M.; Hernández, P.E. Characterization of Garvicin ML, a Novel Circular Bacteriocin Produced by *Lactococcus Garvieae* DCC43, Isolated from Mallard Ducks (*Anas Platyrhynchos*). *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 369–373, doi:10.1128/AEM.01173-10.
113. Kalmokoff, M.L.; Cyr, T.D.; Hefford, M.A.; Whitford, M.F.; Teather, R.M. Butyrivibriocin AR10, a New Cyclic Bacteriocin Produced by the Ruminant Anaerobe *Butyrivibrio Fibrisolvens* AR10: Characterization of the Gene and Peptide. *Can. J. Microbiol.* **2003**, *49*, 763–773, doi:10.1139/w03-101.
114. Wirawan, R.E.; Swanson, K.M.; Kleffmann, T.; Jack, R.W.; Tagg, J.R. 2007 Uberolysin: A Novel Cyclic Bacteriocin Produced by *Streptococcus Uberis*. *Microbiology* **2007**, *153*, 1619–1630, doi:10.1099/mic.0.2006/005967-0.
115. Belguesmia, Y.; Naghmouchi, K.; Chihib, N.-E.; Drider, D. Class IIa bacteriocins: Current knowledge and perspectives. In *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*; Drider, D., Rebuffat, S., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2011; pp. 171–195, ISBN 978-1-4419-7692-5.
116. Belguesmia, Y.; Madi, A.; Sperandio, D.; Merieau, A.; Feuilletoy, M.; Prévost, H.; Drider, D.; Connil, N. Growing Insights into the Safety of Bacteriocins: The Case of Enterocin S37. *Res. Microbiol.* **2011**, *162*, 159–163, doi:10.1016/j.resmic.2010.09.019.
117. Nissen-Meyer, J.; Rogne, P.; Oppedard, C.; Haugen, H.S.; Kristiansen, P.E. Structure-Function Relationships of the Non-Lanthionine-Containing Peptide (Class II) Bacteriocins Produced by Gram-Positive Bacteria. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2009**, *10*, 19–37, doi:10.2174/138920109787048661.
118. Chikindas, M.L.; García-Garcerá, M.J.; Driessen, A.J.; Ledebøer, A.M.; Nissen-Meyer, J.; Nes, I.F.; Abee, T.; Konings, W.N.; Venema, G. Pediocin PA-1, a Bacteriocin from *Pediococcus Acidilactici* PAC1.0, Forms Hydrophilic Pores in the Cytoplasmic Membrane of Target Cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59*, 3577–3584.
119. Chen, Y.; Ludescher, R.D.; Montville, T.J. Electrostatic Interactions, but Not the YGNGV Consensus Motif, Govern the Binding of Pediocin PA-1 and Its Fragments to Phospholipid Vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 4770–4777, doi:10.1128/aem.63.12.4770-4777.1997.
120. Chen, Y.; Shapira, R.; Eisenstein, M.; Montville, T.J. 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.* **1997**, *63*, 524–531.
121. Fimland, G.; Jack, R.; Jung, G.; Nes, I.F.; Nissen-Meyer, J. The Bactericidal Activity of Pediocin SPA-1 Is Specifically Inhibited by a 15-Fmer Fragment That Spans the Bacteriocin from the Center toward the C Terminus. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 5057–5060.

122. Diep, D.B.; Skaugen, M.; Salehian, Z.; Holo, H.; Nes, I.F. Common Mechanisms of Target Cell Recognition and Immunity for Class II Bacteriocins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 2384–2389, doi:10.1073/pnas.0608775104.
123. Kjos, M.; Salehian, Z.; Nes, I.F.; Diep, D.B. An Extracellular Loop of the Mannose Phosphotransferase System Component IIC Is Responsible for Specific Targeting by Class IIa Bacteriocins. *J. Bacteriol. Res.* **2010**, *192*, 5906–5913, doi:10.1128/JB.00777-10.
124. Ríos Colombo, N.S.; Chalón, M.C.; Navarro, S.A.; Bellomio, A. Pediocin-like Bacteriocins: New Perspectives on Mechanism of Action and Immunity. *Curr. Genet.* **2018**, *64*, 345–351, doi:10.1007/s00294-017-0757-9.
125. Barraza, D.E.; Colombo, N.S.R.; Galván, A.E.; Acuña, L.; Minahk, C.J.; Bellomio, A.; Chalón, M.C. New Insights into Enterocin CRL35: Mechanism of Action and Immunity Revealed by Heterologous Expression in Escherichia Coli. *Mol. Microbiol.* **2017**, *105*, 922–933, doi:10.1111/mmi.13746.
126. Zhou, W.; Wang, G.; Wang, C.; Ren, F.; Hao, Y. Both IIC and IID Components of Mannose Phosphotransferase System Are Involved in the Specific Recognition between Immunity Protein PedB and Bacteriocin-Receptor Complex. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0164973, doi:10.1371/journal.pone.0164973.
127. Nissen-Meyer, J.; Oppegård, C.; Rogne, P.; Haugen, H.S.; Kristiansen, P.E. Structure and Mode-of-Action of the Two-Peptide (Class-IIb) Bacteriocins. *Probiotics Antimicro. Prot.* **2010**, *2*, 52–60, doi:10.1007/s12602-009-9021-z.
128. Senes, A.; Engel, D.E.; DeGrado, W.F. Folding of Helical Membrane Proteins: The Role of Polar, GxxxG-like and Proline Motifs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 465–479, doi:10.1016/j.sbi.2004.07.007.
129. Kjos, M.; Oppegård, C.; Diep, D.B.; Nes, I.F.; Veening, J.-W.; Nissen-Meyer, J.; Kristensen, T. Sensitivity to the Two-Peptide Bacteriocin Lactococcin G Is Dependent on UppP, an Enzyme Involved in Cell-Wall Synthesis. *Mol. Microbiol.* **2014**, *92*, 1177–1187, doi:10.1111/mmi.12632.
130. Oppegård, C.; Emanuelsen, L.; Thorbek, L.; Fimland, G.; Nissen-Meyer, J. The Lactococcin G Immunity Protein Recognizes Specific Regions in Both Peptides Constituting the Two-Peptide Bacteriocin Lactococcin G. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 1267–1273, doi:10.1128/AEM.02600-09.
131. Ishibashi, N.; Zendo, T.; Koga, S.; Shigeri, Y.; Sonomoto, K. 2015 Molecular Characterization of the Genes Involved in the Secretion and Immunity of Lactococcin Q, a Two-Peptide Bacteriocin Produced by Lactococcus Lactis QU 4. *Microbiology* **2015**, *161*, 2069–2078, doi:10.1099/mic.0.000157.
132. Kjos, M.; Snipen, L.; Salehian, Z.; Nes, I.F.; Diep, D.B. The Abi Proteins and Their Involvement in Bacteriocin Self-Immunity. *J. Bacteriol.* **2010**, *192*, 2068–2076, doi:10.1128/JB.01553-09.
133. Britton, A.P.; Ende SR van, d.e.r.; Belkum MJ, v.a.n.; Martin-Visscher, L.A. The Membrane Topology of Immunity Proteins for the Two-Peptide Bacteriocins Carnobacteriocin XY, Lactococcin G, and Lactococcin MN Shows Structural Diversity. *MicrobiologyOpen* **2020**, *9*, e00957, doi:10.1002/mbo3.957.
134. Yoneyama, F.; Imura, Y.; Ohno, K.; Zendo, T.; Nakayama, J.; Matsuzaki, K.; Sonomoto, K. Peptide-Lipid Huge Toroidal Pore, a New Antimicrobial Mechanism Mediated by a Lactococcal Bacteriocin, Lacticin Q. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 3211–3217, doi:10.1128/AAC.00209-09.
135. Netz, D.J.; Bastos, M.D.; Sahl, H.G. Mode of Action of the Antimicrobial Peptide Aureocin A53 from Staphylococcus Aureus. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 5274–5280, doi:10.1128/AEM.68.11.5274-5280.2002.
136. Uzelac, G.; Kojic, M.; Lozo, J.; Aleksandrak-Piekarczyk, T.; Gabrielsen, C.; Kristensen, T.; Nes, I.F.; Diep, D.B.; Topisirovic, L. A Zn-Dependent Metallopeptidase Is Responsible for Sensitivity to LsbB, a Class II Leaderless Bacteriocin of Lactococcus Lactis Subsp. Lactis BGMN1-5. *J. Bacteriol. Res.* **2013**, *195*, 5614–5621, doi:10.1128/JB.00859-13.
137. Nascimento, J.D.; Coelho, M.L.; Ceotto, H.; Potter, A.; Fleming, L.R.; Salehian, Z.; Nes, I.F.; Bastos, M.D. Genes Involved in Immunity to and Secretion of Aureocin A53, an Atypical Class II Bacteriocin Produced by Staphylococcus Aureus A53. *J. Bacteriol.* **2012**, *194*, 875–883, doi:10.1128/JB.06203-11.
138. Coelho, M.L.V.; Coutinho, B.G.; Cabral da Silva Santos, O.; Nes, I.F.; Bastos, M. Immunity to the Staphylococcus Aureus Leaderless Four-Peptide Bacteriocin Aureocin A70 Is Conferred by AurI, an Integral Membrane Protein. *Res. Microbiol.* **2014**, *165*, 50–59, doi:10.1016/j.resmic.2013.11.001.
139. Iwatani, S.; Yoneyama, F.; Miyashita, S.; Zendo, T.; Nakayama, J.; Sonomoto, K. Identification of the Genes Involved in the Secretion and Self-Immunity of Lacticin Q, an Unmodified Leaderless Bacteriocin from Lactococcus Lactis QU 5. *Microbiology (Reading)* **2012**, *158*, 2927–2935, doi:10.1099/mic.0.062943-0.
140. Holo, H.; Nilssen, O.; Nes, I.F. Lactococcin A, a New Bacteriocin from Lactococcus Lactis Subsp. Cremoris: Isolation and Characterization of the Protein and Its Gene. *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 3879–3887.
141. Martínez, B.; Böttiger, T.; Schneider, T.; Rodríguez, A.; Sahl, H.-G.; Wiedemann, I. Specific Interaction of the Unmodified Bacteriocin Lactococcin 972 with the Cell Wall Precursor Lipid II. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 4666–4670, doi:10.1128/AEM.00092-08.

142. Venema, K.; Haverkort, R.E.; Abee, T.; Haandrikman, A.J.; Leenhouts, K.J.; de Leij, L.; Venema, G.; Kok, J. Mode of Action of LciA, the Lactococcal Immunity Protein. *Mol. Microbiol.* **1994**, *14*, 521–532, doi:10.1111/j.1365-2958.1994.tb02186.x.
143. Nilsen, T.; Nes, I.F.; Holo, H. Enterolysin A, a Cell Wall-Degrading Bacteriocin from *Enterococcus Faecalis* LMG 2333. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 2975–2984, doi:10.1128/AEM.69.5.2975-2984.2003.
144. Barrett, A.J.; Rawlings, N.D. Families and Clans of Cysteine Peptidases. *Perspect. Drug Discov. Des.* **1996**, *6*, 1–11, doi:10.1007/BF02174042.
145. Méndez-Vilas, A. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*; Formatex Research Center, Norristown, PA, USA; 2010; ISBN 978-84-614-6195-0.
146. Kim, S.J.; Chang, J.; Singh, M. Peptidoglycan Architecture of Gram-Positive Bacteria by Solid-State NMR. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1848*, 350–362, doi:10.1016/j.bbamem.2014.05.031.
147. Khan, H.; Flint, S.H.; Yu, P.-L. Determination of the Mode of Action of Enterolysin A, Produced by *Enterococcus Faecalis* B9510. *J. Appl. Microbiol.* **2013**, *115*, 484–494, doi:10.1111/jam.12240.
148. Bastos, M.D.; Coutinho, B.G.; Coelho, M.L. Lysostaphin: A Staphylococcal Bacteriolysin with Potential Clinical Applications. *Pharmaceuticals* **2010**, *3*, 1139–1161, doi:10.3390/ph3041139.
149. Sun, Z.; Wang, X.; Zhang, X.; Wu, H.; Zou, Y.; Li, P.; Sun, C.; Xu, W.; Liu, F.; Wang, D. Class III Bacteriocin Helveticin-M Causes Sublethal Damage on Target Cells through Impairment of Cell Wall and Membrane. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *45*, 213–227, doi:10.1007/s10295-018-2008-6.
150. Gargis, S.R.; Heath, H.E.; LeBlanc, P.A.; Dekker, L.; Simmonds, R.S.; Sloan, G.L. Inhibition of the Activity of Both Domains of Lysostaphin through Peptidoglycan Modification by the Lysostaphin Immunity Protein. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 6944–6946, doi:10.1128/AEM.01066-10.
151. Gargis, S.R.; Gargis, A.S.; Heath, H.E.; Heath, L.S.; LeBlanc, P.A.; Senn, M.M.; Berger-Bächi, B.; Simmonds, R.S.; Sloan, G.L. Zif, the Zoocin Immunity Factor, Is a FemABX-like Immunity Protein with a Novel Mode of Action. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 6205–6210, doi:10.1128/AEM.01011-09.
152. Joerger, M.C.; Klaenhammer, T.R. Characterization and Purification of Helveticin J and Evidence for a Chromosomally Determined Bacteriocin Produced by *Lactobacillus Helveticus* 481. *J. Bacteriol.* **1986**, *167*, 439–446, doi:10.1128/jb.167.2.439-446.1986.
153. Collins, F.W.J.; O'Connor, P.M.; O'Sullivan, O.; Gómez-Sala, B.; Rea, M.C.; Hill, C.; Ross, R.P. Bacteriocin Gene-Trait Matching across the Complete *Lactobacillus* Pan-Genome. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 3481, doi:10.1038/s41598-017-03339-y.
154. Gálvez, A.; Abriouel, H.; López, R.L.; Ben Omar, N. Bacteriocin-Based Strategies for Food Biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *120*, 51–70, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.001.
155. Younes, M.; Aggett, P.; Aguilar, F.; Crebelli, R.; Dusemund, B.; Filipič, M.; Frutos, M.J.; Galtier, P.; Gundert-Remy, U.; Kuhnle, G.G.; et al. Safety of Nisin (E 234) as a Food Additive in the Light of New Toxicological Data and the Proposed Extension of Use. *EFSA J.* **2017**, *15*, e05063, doi:10.2903/j.efsa.2017.5063.
156. Faustman, C.; Aaron, D.; Negowetti, N.; Leib, E.B. Ten Years Post-GAO Assessment, FDA Remains Uninformed of Potentially Harmful GRAS Substances in Foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2021**, *61*, 1260–1268, doi:10.1080/10408398.2020.1756217.
157. O'Neill, J. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *15*, 526–526, doi:10.1038/nrd.2016.160.
158. Mesa-Pereira, B.; Rea, M.C.; Cotter, P.D.; Hill, C.; Ross, R.P. Heterologous Expression of Biopreservative Bacteriocins with a View to Low Cost Production. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1654, doi:10.3389/fmicb.2018.01654.
159. Hols, P.; Ledesma-García, L.; Gabant, P.; Mignolet, J. Mobilization of Microbiota Commensals and Their Bacteriocins for Therapeutics. *Trends Microbiol.* **2019**, *27*, 690–702, doi:10.1016/j.tim.2019.03.007.
160. Drider, D. Gut Microbiota Is an Important Source of Bacteriocins and Their In Situ Expression Can Be Explored for Treatment of Bacterial Infections. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2021**, doi:10.1007/s12602-021-09843-y.
161. Zgheib, H.; Drider, D.; Belguesmia, Y. Broadening and Enhancing Bacteriocins Activities by Association with Bioactive Substances. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 7835, doi:10.3390/ijerph17217835.

## 5. Applications des bactériocines produites par les bactéries lactiques

Au cours de ces dernières années, les bactériocines ont suscité un grand intérêt en tant qu'agents antimicrobiens potentiels contre différentes espèces bactériennes, fongiques et virales (Meade et al., 2020; Simons et al., 2020). En effet, en raison de leur faible toxicité envers les cellules Eucaryotes, les bactériocines produites par les BLs représentent une alternative pour remplacer les antibiotiques dans le traitement des maladies infectieuses, chez l'homme et l'animal, et peuvent être utilisées également dans la biopréservation des aliments (Cebrián et al., 2019; Negash and Tsehai, 2020; Ng et al., 2020). A ce jour, seule la nisine est approuvée par l'U.S. FDA en tant que conservateur alimentaire (E234) conformément à l'annexe du règlement CE 1333/2008. Néanmoins, comme précisé précédemment (Pérez-Ramos et al., 2021), de nombreuses bactériocines identifiées au cours de ces dernières années, ont suscité un intérêt pour un usage thérapeutique.

### 5.1. Utilisation des bactériocines en agroalimentaire

Les bactériocines peuvent être utilisées seules ou associées avec d'autres techniques de conservation pour améliorer la biopréservation de nombreux aliments (viandes, produits laitiers, poissons, boissons alcoolisées, salades et légumes fermentés... ) (Vuyst and Leroy, 2007). Elles peuvent être incorporées dans les aliments sous différentes formes (O'Connor et al., 2020) :

- **Bactériocine pure**, c'est le cas notamment de la nisine Z, un variant de la nisine présentant une meilleure solubilité à un pH plus élevée, qui est commercialisée sous forme de nisine ultrapure (NisinZ<sup>®</sup>). Cette nisine est utilisée pour augmenter la durée de vie des aliments en inhibant la croissance des bactéries pathogènes tels que *Listeria*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium* et les bactéries sporulées (Silva et al., 2018).
- **Bactériocines semi-purifiées**. Par exemple la bactériocine pédiocine Pa-1 de classe IIa, dont l'activité anti-*Listeria* a été démontrée, n'est pas disponible sur le marché sous forme pure. Seule les fraction semi-purifiée et/ou des cultures lyophilisées produisant de la pédiocine, sont approuvées par la FDA (Bédard et al., 2018).
- **Souches productrices de bactériocines**, notamment celles reconnues en tant que GRAS. Elles sont utilisées en tant que « starter de fermentation », dans le but d'améliorer la qualité sanitaire de l'aliment mais aussi de contribuer à ses qualités organoleptiques (goût, odeur, qualité nutritionnelle...). Pour les industries agroalimentaires, cette approche est plus avantageuse que l'utilisation de bactériocines

pures car faisant l'objet de moins de contrôles réglementaires, d'autant plus que cela revient moins cher.

Ces dernières années de nombreuses bactériocines identifiées, produites par les BLs, ont montré un intérêt potentiel dans la biopréservation des aliments. Par exemple, la plantaricycline A, une bactériocine circulaire (Classe Ib) produite par *Lactobacillus plantarum* NI326, présente une activité contre la bactérie *Alicyclobacillus acidoterrestris*, responsable de l'altération des qualités organoleptiques des boissons et causant chaque année des pertes économiques importantes à ce secteur (Yue et al., 2013; Grande Burgos et al., 2014).

Autre exemple, la lacticine 3147, lantibiotique à deux peptides présentant une activité antimicrobienne contre un grand nombre de bactéries à Gram-positif pathogènes et responsables de la dégradation des aliments, (Sobrino-López et Martín-Belloso, 2008 ; Martínez-Cuesta et al., 2010), s'est avérée être efficace pour inhiber *Listeria* et *Bacillus* présent dans les préparations de lait pour nourrisson, du yaourt naturel et fromage blanc (Morgan et al., 2001; Silva et al., 2018).

La souche *Enterococcus mundtii* CRL35 a par ailleurs montré des résultats prometteurs lorsqu'elle est utilisée comme starter de fermentation. En effet, elle inhibe la croissance de *L. monocytogenes* pendant la fermentation de la viande, grâce à la production d'entéroline CRL35, une bactériocine de classe IIa. La capacité d'*E. mundtii* à se développer dans un milieu salin et à exercer un effet protecteur dans les viandes fermentées est donc particulièrement avantageuse (Orihuel et al., 2018).

## **5.2. Applications thérapeutiques des bactériocines en santé humaine et en médecine vétérinaire animale**

Les bactériocines produites par les BLs possèdent un immense potentiel dans le domaine pharmaceutique. En effet de nombreuses études préliminaires ont montré l'efficacité de ces molécules contre les bactéries pathogènes à Gram-négatif.

Par exemple, Thapa et al. (2021) ont développé un hydrogel hybride appelé gel GarKS, composé de Pluronic F127 (PF127), de liposomes chargés d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA), de glutathion (GSH) et de la garvicine (bactériocine de classe IIc). *In vitro*, le gel GarKS a montré une activité antibactérienne et anti-biofilm puissante contre la bactérie *Staphylococcus aureus*. De plus, des résultats similaires ont été obtenus *in vivo*. En effet, le traitement des plaies de souris infectées par le *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) avec

du gel GarK, a montré une inhibition complète des bactéries SARM après plusieurs applications (une fois par jour pendant trois jours consécutifs) (Thapa et al., 2021). De même, certaines bactériocines, tels que l'enterocin DD14 et la nisine, ont montré un effet synergétique avec la colistine sur des souches résistantes à la colistine (Al Atya et al., 2016).

Les bactériocines présentent aussi un intérêt potentiel dans la pratique vétérinaire. Elle pourraient ainsi être utilisées comme alternatives aux antibiothérapies pour traiter les infections bactériennes ou alors pour stimuler la croissance des animaux d'élevage (Ben Lagha et al., 2017). Par exemple la lacticine 3147 (lantibiotique) produite par *L. lactis subsp. lactis* DPC 3147, a montré une activité inhibitrice contre plusieurs souches de *S. aureus* et de streptocoques (*S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* et *S. uberis*) responsables de la mammite bovine (inflammation des tissus internes de la glande mammaire). De même, des bactériocines produites par des souches de *Staphylococcus* (aureocin A70, aureocin A53, aureocin 215FN, Pep5, epidermin, epilancin K7 et epicidin 280) ont montré également une activité *in vitro* contre *S. aureus* et *S. agalactiae* (Schofs et al., 2020).

### 5.3. Multifonction des bactériocines

Les fonctions des bactériocines produites par les BLs ne se limitent pas qu'à leurs pouvoirs antibactériens. Ces dernières années, de nombreuses propriétés antivirales et anti-cancéreuses ont été ainsi révélées (Drider et al., 2016; Chikindas et al., 2018).

Par exemple, l'entérocin CRL35 produite par *Enterococcus faecium* CRL35 présente une activité contre les virus humains tels que l'Herpès Simplex (HSV) de type 1 et 2 (Wachsman et al., 1999). Les auteurs ont montré que l'entérocin CRL35 inhibait la multiplication virale de façon dose-dépendante sans pour autant avoir un effet virucide. L'activité antivirale HSV-1 a également été observée chez d'autres bactériocines, telle que la pédiocine ST5Ha produite par *Enterococcus faecium* ST5Ha et la subtilosine produite par *Bacillus amyloliquefaciens*. Tout comme l'entérocin CRL35, la subtilosine semble inhiber les dernières étapes du cycle de réplication virale (Drider et al., 2016).

De nombreuses études ont mis en évidence l'activité cytotoxique sélective de certaines bactériocines produites par les BLs envers des lignées cellulaires cancéreuses (Kaur and Kaur, 2015; Nguyen and Nguyen, 2016; Baidara et al., 2018; Al-Madboly et al., 2020). Par exemple, la pédiocine PA-1 produite par *Pediococcus acidilactici* inhibait la croissance des lignées cellulaires A-549 (un carcinome pulmonaire humain) et DLD-1 (un adénocarcinome du côlon humain) (Beaulieu, 2005). De même, la bactériocine de classe IId, laterosporulin 10 produite

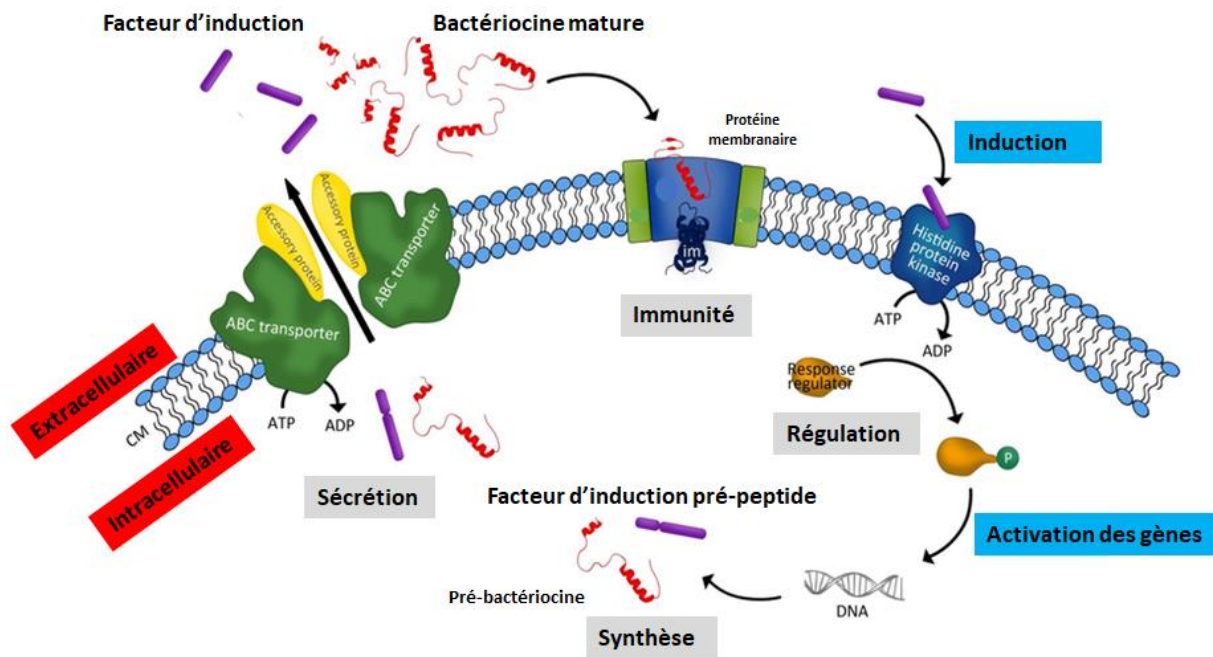
par *Brevibacillus sp.* SKDU10 provoque la mort apoptotique et nécrotique des cellules cancéreuses (MCF-7, HEK293T, HT1080, HeLa et H1299) à une concentration inférieure à 10  $\mu$ M (Baindara et al., 2018). Un autre exemple décrit dans la littérature est celui de la bactériocine circulaire entérotoxicine LNS18, qui a montré un effet anticancéreux sur cellules HepG2, ceci sans aucun effet cytotoxique significatif sur les cellules de fibroblastes normales. Son mode d'action contre les cellules HepG2 pourrait être expliqué par son efficacité à induire des espèces réactives d'oxygène cellulaires, à diminuer les marqueurs CD de HepG2 et à arrêter les cellules en phase G0 (Al-Madboly et al., 2020).

A noter que les bactériocines peuvent être impliquées également dans la régulation des microbiotes, y compris le microbiote intestinal (Drider et al., 2016). En effet, dans l'intestin, les bactériocines peuvent aider la souche productrice à survivre et à coloniser le tractus en inhibant les souches compétitives ou les souches pathogènes étroitement liées. Elles peuvent également influencer le système immunitaire de l'hôte grâce à leurs impacts sur les populations microbiennes intestinales (Umu et al., 2017).

## **6. Expression des bactériocines produites par les bactéries lactiques**

Comme indiqué dans les chapitres précédents, la biosynthèse de la plupart des bactériocines produites par les BLs est régulée par un mécanisme de QS. En effet, cette biosynthèse est contrôlée par un système à trois composants contenant un peptide-phéromone (pré-bactériocine), une histidine kinase et un régulateur transcriptionnel (**Fig. 11**). Dans certains cas, par exemple chez les lantibiotiques, c'est la bactériocine mature elle-même qui va déclencher sa propre production (Turovskiy et al., 2007; Kareb and Aider, 2020). Une fois produite, les bactériocines sont secrétées dans le milieu extracellulaire via un ABC transporteur.





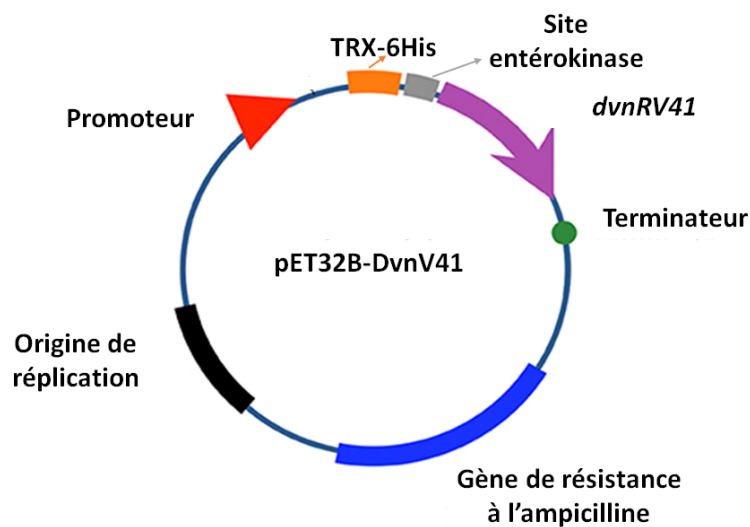
**Figure 11** . Régulation de la production des bactériocines par Quorum Sensing (QS) (Wan et al., 2013).

Pour être utilisées, les bactériocines sont en général purifiées à partir du surnageant de culture de la souche cible par des méthodes standards en trois étapes ; comprenant une étape de précipitation au sulfate d'ammonium, suivie d'une l'extraction/précipitation au chloroforme/méthanol et une étape de chromatographie liquide haute pression en phase inverse (Vuyst and Leroy, 2007) . Cependant avec ces méthodes, bien que la pureté des bactériocines obtenues soit très élevée (proche de 100%), le rendement reste faible.

Grâce aux progrès des approches *in silico* et au développement des bases de données permettant l'identification des gènes putatifs de bactériocines, celles-ci peuvent maintenant être exprimées en système hétérologue directement en utilisant l'information génétique caractérisée en amont. Ceci permettant d'améliorer les rendements de production et la quantité disponible de bactériocines par rapport à ceux obtenus en système natif. Plusieurs facteurs (choix des systèmes hétérologues, milieu de culture, température...) permettent ainsi l'optimisation de leur production. Les souches d'*E. coli* en tant qu'hôte sont un choix intéressant pour l'expression des bactériocines en système hétérologue, du fait de leur croissance rapide sur des milieux peu coûteux, de leur caractérisation génétique approfondie et de la disponibilité d'outils de clonage, de systèmes d'expression et de souches polyvalentes (Mesa-Pereira et al., 2018).

Dans la majorité des cas, le gène structural de la bactériocine mature est suffisant pour la production de la bactériocine active en système hétérologue (Richard et al., 2004; Ingham et al., 2005). Dans d'autres cas, la co-expression du gène structural de la bactériocine mature avec d'autres gènes tels que les gènes impliqués dans les modifications post-traductionnelles de la bactériocine, sont nécessaires pour leurs expressions dans un système hétérologue (Gutiérrez et al., 2005; Shi et al., 2012).

Il est à noter que l'expression des bactériocines dans un système hétérologue nécessite l'utilisation d'un vecteur d'expression (**Fig. 12**) contenant une origine de réplication, un marqueur de sélection (généralement des gènes codant pour la résistance aux antibiotiques), une région promotrice pour l'initiation de la transcription du gène, un site de clonage (MCS (multiples cloning site) pour faciliter le clonage des gènes de la bactériocine et une étiquette permettant soit la détection de la bactériocine lors de l'étape de purification (étiquette poly-histidine) et/ou une étiquette améliorant leur solubilité en contribuant à leur repliement (Mesa-Pereira et al., 2018).



**Figure 12** . Schéma du vecteur d'expression de la divéricine V41 (plasmide pET32B-DvnV41) (Richard et al., 2004).

Cependant, de nombreuses variables peuvent affecter la production de bactériocines en système hétérologue. Par exemple, dans certains cas la surexpression de bactériocines pourrait interférer avec la croissance et la viabilité de la souche utilisée comme système hétérologue, limitant ainsi leur production (Mesa-Pereira et al., 2018).

**OBJECTIFS DE L'ETUDE**

**OBJECTIVES OF THE DISSERTATION**

Récemment, des études réalisées au sein de notre laboratoire (l'UMRT BioEcoAgro 1158) ont pu mettre en évidence l'activité anti-Gram négative de la souche de *Lacticaseibacillus paracasei* CNCM I-5369. En effet, celle-ci produit cinq nouvelles bactériocines de classe II, très probablement de type leaderless, ayant une activité à la fois contre les bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif incluant des souches résistantes à la colistine (Belguesmia et al., 2020a). Cette activité est due à l'action synergétique des bactériocines couplée à un pH acide (compris entre 4,5 et 5). L'analyse *in silico* du génome de *L. paracasei* CNCM I-5369, à l'aide du logiciel Bagel 3, a permis d'identifier 5 gènes (*orf010*, *orf012*, *orf023*, *orf030*, *orf038*) codant pour ces nouvelles bactériocines (Belguesmia et al., 2020a).

Cette thèse a pour objectif fondamental de comprendre ou de donner les premiers éléments de compréhension du mode d'action des bactériocines produites par la souche de *L. paracasei* CNCM I-5369, contre les bactéries à Gram-négatif utilisées.

Cette thèse a pour objectif appliqué de mettre en relief ces bactériocines, comme molécules alternatives aux antibiotiques, dans le secteur médical, plus particulièrement celui de la médecine vétérinaire. Pour ce faire, ces bactériocines seront testées seules, ou en combinaison avec des antibiotiques telle que la colistine, afin de générer de nouveaux sites actifs de formulations thérapeutiques utilisables dans la lutte contre les infections causées par les bacilles à Gram-négatif.

Ainsi, les objectifs de cette thèse se déclinent en trois grandes parties :

- **Partie I** : Nous caractériserons *in silico* les bactériocines de *L. paracasei* CNCM I-5369 identifiées par Bagel3, puis nous étudierons leur expression en système natif. Ensuite, les gènes codant ces bactériocines seront exprimés en système hétérologue et leurs activités anti *E. coli* seront caractérisées en utilisant comme cible *E. coli* ATCC 8739.
- **Partie II** : Nous étudierons la relation structure-activité d'une de ces bactériocines, plus particulièrement celle qui est codée par l'*orf030* appelée lacticasécine 30, en raison de sa facilité de production et de purification. Pour cela, la structure secondaire sera prédite avec le logiciel I-Tasser puis confirmée par une analyse en dichroïsme circulaire. Ensuite, nous déterminerons d'une part la région de la lacticasécine 30 qui joue un rôle important dans l'activité antibactérienne. Pour cela des variants peptidiques contenant la partie N-terminale (N-ter-lacticasécine 30), la partie centrale et C-terminale (C-ter-

lacticaséicine 30), ou encore les premiers acides de la partie N-terminale (N-ter-H1-lacticaséicine 30) seront générés et analysés pour leurs activités antibactériennes. Par ailleurs des dérivés de la lacticaséicine 30 contenant des mutations spécifiques dans des régions jugées déterminantes seront générés et testés contre les bactéries à Gram-négatif.

- **Partie III** : Nous testerons la lacticaséicine 30 contre de souches multirésistantes à Gram-négatif d'origines cliniques, puis nous évaluerons les effets de l'association de la lacticaséicine 30 et de la colistine contre ces souches cliniques. Outre l'analyse d'un effet synergique, nous identifierons les gènes responsables de la résistance à la colistine chez ces souches cliniques et étudierons leurs expressions par la technique de qPCR en présence des agents antibactériens seuls, ou en combinaison.

**Chapitre 1 : Expression des bactériocines de  
*Lacticaseibacillus paracasei* CNCM I-5369 ayant une  
activité contre *Escherichia coli*, en système natif et  
hétérologue**

Expression of *Lacticaseibacillus paracasei* CNCM I-5369  
bacteriocins with activity against *Escherichia coli*, in native  
and heterologous systems

## RESUME

La souche de *Lacticaseibacillus paracasei* CNCM I-5369, isolée à partir d'un produit laitier Algérien, a montré une activité anti *E. coli* à un pH compris entre 4,5 et 5. L'analyse *in-silico* du génome à l'aide du logiciel Bagel a permis d'identifier cinq gènes (*orf010*, *orf012*, *orf023*, *orf030* et *orf038*) codant des bactériocines de classe II, très probablement de type leaderless, et qui sont respectivement nommées ORF010, ORF012, ORF023, ORF030 et ORF038. Ces cinq bactériocines présentent très peu voire pas d'homologies de séquences avec les bactériocines connues, selon les analyses bioinformatiques.

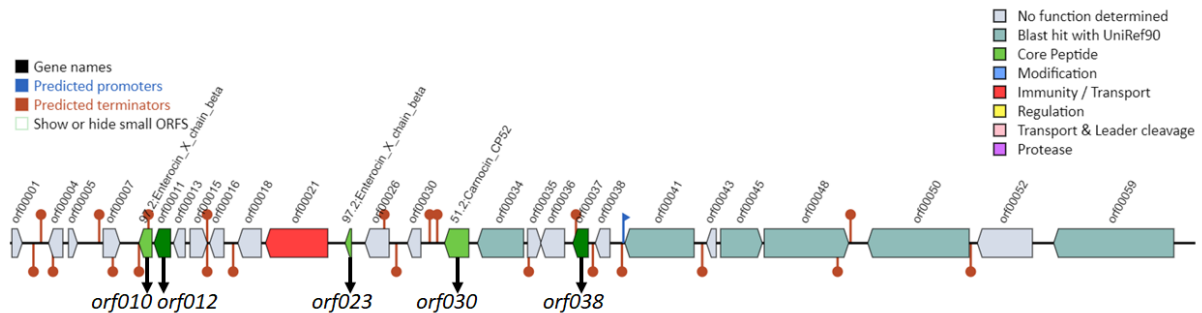
Par ailleurs, l'analyse *in-silico* transcriptionnelle a permis d'identifier les régions régulatrices potentielles (promotrices et terminatrices) de chacun de ces gènes.

De plus, le niveau d'expression de chacun de ces gènes en système natif a été analysé par qPCR. Pour cela, une culture de *L. paracasei* CNCM I-5369 a été réalisée. Des échantillons ont été prélevés au début (T=7h) et à la fin de la phase exponentielle (T=24h) de croissance. Les ARN totaux de chaque échantillon ont été extraits et convertis en ADNc, puis analysés par qPCR. Les cinq gènes de bactériocines sont exprimés à t= 24h, avec une surexpression des gènes *orf023*, *orf030* et *orf038*. Le résultat de la qPCR semble être corrélé avec l'activité antibactérienne de la souche *L. paracasei* CNCM I-5369 indiquant un lien entre l'expression de ces gènes et la production des bactériocines.

Nous avons ensuite décidé d'exprimer chaque gène en système hétérologue en utilisant *E. coli* Rosetta. Les conditions optimales pour l'expression des peptides ont été établies. Au terme de cette analyse, seule la bactériocine codée par l'*orf030*, appelée alors ORF030 et rebaptisée récemment lacticaséicine 30 a été produite et purifiée en grande quantité. Les autres bactériocines ont également été produites mais sont restées piégées dans les corps d'inclusion. Toutefois, un traitement avec 4 M d'urée a été mis au point, il a permis d'ailleurs de récupérer une faible partie de ces peptides recombinants présents dans les fractions insolubles. Tous les peptides produits en système hétérologue ont été caractérisés par la technique de spectrométrie de masse MALDI TOF et présentaient bien une activité *anti-E. coli* à un pH compris entre 4,5 et 5, à l'image du surnageant de culture de la souche native d'origine.

## Caractérisation *in silico* des bactériocines de classe II de *Lactocaseibacillus paracasei* CNCM I-5369

Pour rappel, l'analyse *in silico* du génome de *L. paracasei* CNCM I-5369 à l'aide du logiciel Bagel (<http://bagel4.molgenrug.nl/>) a permis d'identifier cinq gènes de bactériocines nommés *orf010*, *orf012*, *orf023*, *orf030* et *orf038* (Fig. 13).



**Figure 13.** Identification des cinq gènes de bactériocines de classe II chez *L. paracasei* CNCM I-5369 à l'aide de Bagel4.

Les séquences en acides aminés des bactériocines ORF010, ORF012, ORF023, ORF030 et ORF038 ont également été obtenues à l'aide du logiciel Bagel. Par la suite, nous avons déterminé leurs caractéristiques biochimiques à l'aide du logiciel Expasy (<https://www.expasy.org/>) (Tableau 5). Comme nous pouvons le constater, les cinq bactériocines présentent une faible masse moléculaire (comprise entre 3 000 Da et 13 000 Da) et sont relativement hydrophobes. De même, leurs charges totales ont été définies à partir du nombre d'acides aminés chargés positivement (arginine et lysine) et chargés négativement (acide aspartique et acide glutamique) présents dans leurs séquences. Ils s'avèrent que à pH 7, les bactériocines ORF010, ORF023 et ORF030 sont des peptides anioniques tandis que les bactériocines ORF012 et ORF038 sont des peptides cationiques. Par ailleurs, l'analyse des séquences peptidiques des cinq bactériocines ne montrent aucune cystéine, excepté la bactériocine ORF038 qui présente deux cystéines, suggérant la présence de ponts disulfure potentiellement impliqués dans la stabilisation de la structure de ORF038.

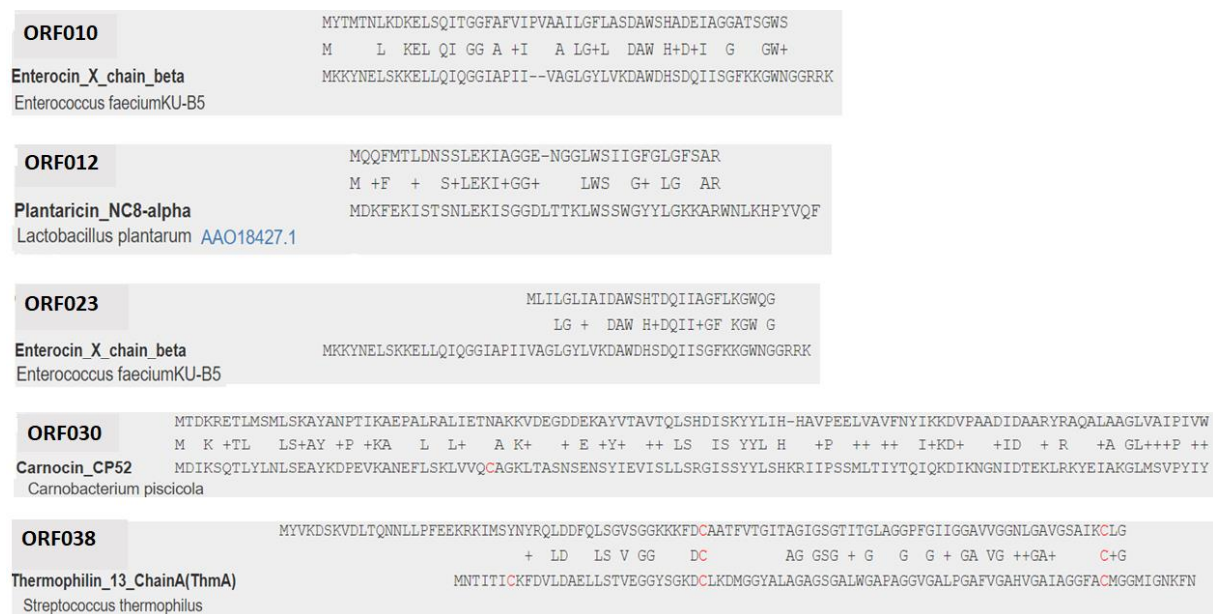
Les séquences protéiques des bactériocines de *L. paracasei* CNCM I-5369 ont été comparées avec celles d'autres bactériocines produites par les bactéries à Gram-positif, y compris les BLs, à l'aide du logiciel Bagel4 et de l'outil BLASTP de NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).



**Tableau 5.** Caractéristiques biochimiques des bactériocines de *L. paracasei* CNCM I-5369, déterminés à l'aide du logiciels Expasy

Nom	Séquences	Masse moléculaire (Da)	Pi
ORF010	MYTMTNLKDKELSQITGGFAFVIPVAAILGFLASDAWSHADEIAGGATSGWSLA DKSHSL <b>Peptide anionique</b>	6300.12	4.86
ORF012	MQQFMTLDNSSLEKIAGGENGLWSIIGFGLGFSARSVLTGSLFVPSRGPVIDLV KQLTPKN <b>Peptide cationique</b>	6581.61	8.25
ORF023	MLILGLIAIDAWSHTDQIIAGFLKGWQGM <b>Peptide anionique</b>	3199.82	5.19
ORF030	MTDKRETLSMLSKAYANPTIKAEPALRALIETNAKKVDEGDDEKAYVTAVTQ LSHDISKYLYLHHAHVPEELVAVFNYIKKDVPAADIDAARYRAQALAAGLVAIPIV WGH <b>Peptide anionique</b>	12252.09	6.05
ORF038	MYVKDSKVDLTQNNLLPFEEKRKIMSINYRQLDDFQLSGVSGGKKKFDCAATF VTGITAGIGSGTITGLAGGPFGIIGGAVVGGN LGAVGSAIKCLGDGMQ <b>Peptide cationique</b>	10394.94	8.62

**Résidus hydrophobes**



**Figure 14.** Blast des séquences protéiques des bactériocines de *L. paracasei* CNCM I-5369 sur Bagel4

Les bactériocines ORF010, ORF012, ORF023, ORF030 et ORF038 montrent très peu, voire pas de similarités de séquences avec les bactériocines produites par les bactéries à Gram-positif (**Fig. 14**) présentes dans les bases de données. En effet, selon l’outil blast de Bagel, la bactériocine ORF012 présente un bit-score de 31,96 avec la plantaricine NC8 (bactériocine de classe II-b), ORF030 présente un bit-score de 74,33 avec la carnocine CP52 (bactériocine de classe II-a), tandis que ORF038 présente un bit-score de 34,65 avec la thermophiline 13 qui est une bactériocine appartenant à la classe II. En revanche, les bactériocines ORF010 et ORF023 présentent respectivement un bit score de 46,98 et 39,66 avec la bactériocine enterocin X

(bactériocine de classe II-b). A noter que la bactériocine ORF023 affiche un pourcentage d'identité de 56% et une e-value de  $7^{-10}$  avec la région C-terminale de l'ORF010 (**Fig. 15**). Le bit-score est un autre indicateur statistique de similarité de séquence, il n'est significatif que lorsque il est supérieur à 50 (Pearson, 2013).

```

ORF010      1  MYTMTNLKDKELSQITGGFAFVIPVAAILGFLASDAWSHADEIAGGATSGWSLADKSHSL      60
ORF023      1  -----MLILGLIAIDAWSHTDQIIAGFLKGWQGM-----      29
                                     ***:;* *****:*.*.*.***

```

**Figure 15.** Comparaison des séquences peptidiques de l'ORF010 et l'ORF023 réalisée à l'aide du logiciel Uniprot (<https://www.uniprot.org/align/>).

Cependant la comparaison de séquences des bactériocines de *L. paracasei* CNCM I-5369 avec d'autres bactériocines telles que les microcines et les colicines ne montrent aucune homologie de séquences.

L'expression des cinq bactériocines en systèmes natif et hétérologue ainsi que la caractérisation de leurs activités anti *E. coli* vont être abordées dans l'article ci-dessous.

**Publication 2 : Expression des cinq bactériocines de classe  
II ayant une activité contre *Escherichia coli* dans  
*Lacticaseibacillus paracasei* CNCM I-5369, et dans un hôte  
hétérologue**

Expression of five class II bacteriocins with activity against  
*Escherichia coli* in *Lacticaseibacillus paracasei* CNCM I-  
5369, and in a heterologous host



## Expression of five class II bacteriocins with activity against *Escherichia coli* in *Lactocaseibacillus paracasei* CNCM I-5369, and in a heterologous host

Désiré Madi-Moussa, Françoise Coucheney, Djamel Drider\*

UMR Transfrontalière BioEcoAgro1158, Univ. Lille, INRAE, Univ. Liège, UPJV, YNCREA, Univ. Artois, Univ. Littoral Côte d'Opale, ICV – Institut Charles Viollette, F-59000 Lille, France



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 20 March 2021

Received in revised form 16 May 2021

Accepted 17 May 2021

#### Keywords:

*Lactocaseibacillus paracasei*

Class II bacteriocins

Heterologous expression

RT-qPCR

### ABSTRACT

Five open reading frames viz *orf010*, *orf12*, *orf023*, *orf030* and *orf038* coding class II bacteriocins in *Lactocaseibacillus paracasei* CNCM I-5369 strain previously isolated from an Algerian dairy product, were found to be expressed after 24 h of growth. The strain has also shown anti-*E. coli* activity in a narrow pH range between 4.5 and 5. Then, expression and purification of these bacteriocins was conducted in the heterologous host *E. coli*. This strategy enabled us to purify the peptide encoded by *orf030* in large quantities, in contrast to other peptides that were produced but required to be released from the insoluble fraction following 4 M urea and desalting treatments. All peptides heterologously produced were characterized by MALDI TOF Mass spectrometry and successfully tested for their anti-*E. coli* activity. Furthermore, *in silico* transcriptional analysis was determined by Findterm tool and with Bagel4 software permitted to locate potential promoters and co-transcription events.

© 2021 Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. Introduction

In the 20th century, the discovery of antibiotics enabled a major decline in bacterial infection-related mortality and morbidity. Antibiotics impacted on the whole practice of medicine by minimizing the risk of infectious diseases. The overuse and misuse of antibiotics in human and veterinary medicine has led to the development of resistant strains with compromised therapeutic options, tending to threaten human health. Bacteria have developed a plethora of mechanisms of resistance including (i) the production of enzymes that degrade or modify antibiotics, (ii) the development of efflux pumps that drive antibiotics outside the cell, (iii) the modification of the targeted sites. Genes involved in intrinsic resistance to antibiotics of different classes, such as  $\beta$ -lactams, fluoroquinolones and aminoglycosides have been identified. These genes can be transferred between bacteria [1], and usually using mobile genetic elements such as plasmids, integrons and introns [2,3]. The World Health Organization (WHO) is continuously warning on this threat and encourages new strategies and interventions to tackle drug-resistance [4].

Antimicrobial peptides (AMPs) can help curb the AMR crisis. AMPs are present in all living cells [5,6], as part of the first line defence against foreign attacks. Many AMPs have the particularity of being cationic and can bind and interact with the negatively charged bacterial cell membranes, causing leakage of intracellular constituents, ATP depletion and cell death [7].

Bacteriocins are a class of AMPs ribosomally synthesized by Gram-positive and Gram-negative bacteria [8,9], and are steadily reported for their positive clinical outcomes [10]. These safe molecules [11–13] can be of narrow or broad spectrum [14] which offers numerous advantages over clinical antibiotics. The classification of bacteriocins has regularly been updated taking into consideration recent achievements and new knowledge. Currently there is no any universally accepted scheme of bacteriocins classification. Nevertheless, we refer here to the classification proposed by Alvarez-Sieiro et al, [15], which includes 3 main classes. Class I contains all peptides that undergo post-translational enzymatic modifications during their biosynthesis, leading to unusual amino acids, such as lanthionine. Class II includes unmodified bacteriocins with a low molecular weight (<10 kDa); and class III contains unmodified bacteriocins with a molecular mass higher than 10 kDa, and endowed with bacteriolytic or non-bacteriolytic modes of action.

Bacteriocins among Gram-positive bacteria are most often produced by lactic acid bacteria (LAB). These bacteriocins are

\* Corresponding author.

E-mail address: [djamel.drider@univ-lille.fr](mailto:djamel.drider@univ-lille.fr) (D. Drider).

usually active against other Gram-positive bacteria, and seldom against Gram-negative bacteria, which are recalcitrant because of structure of their outer-membrane. The discovery and characterization of LAB-bacteriocins possessing activity against Gram-negative bacteria is of paramount interest for clinical issues.

In regard to characterization of LAB-bacteriocins endowed with activity against Gram-negative bacteria, our previous work reported the isolation of *Lacticaseibacillus paracasei* CNCM I-5369 strain carrying five genes (*orf010*, *orf012*, *orf023*, *orf030* and *orf038*) coding for class II bacteriocins [16]. These bacteriocins were heterologously expressed in *E. coli* BL21 and shown to be active against *E. coli* ATCC 8739 [16]. The present study is a continuation, which is aimed at evaluating the expression of each gene coding for these bacteriocins and defining the appropriate conditions for their effective purification.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains, culture conditions and plasmids

Bacterial strains used in this work are listed in Table 1. The strain *L. paracasei* CNCM I-5369 was grown in de Man, Rogosa and Sharpe medium (MRS, from SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA) supplemented with 0.1 % Tween 80 at 37 °C [17]. All the *E. coli* strains were grown in Luria-Bertani broth (LB) or Brain Heart Infusion (BHI, SIGMA-ALDRICH Saint-Louis, USA) at 37 °C with shaking at 160 rpm.

### 2.2. Total RNA extraction and cDNA synthesis

Cells from *L. paracasei* CNCM I-5369 were harvested by centrifugation from a culture of 10 ml at the beginning and at the end of the logarithmic growth phase. Total RNA was extracted using the NucleoSpin RNA Set for NucleoZOL (MACHERY-NAGEL, Düren, Germany). Then, 1 µg of total RNA from each sample was treated with DNase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, United States) in order to remove all traces of DNA. After inactivation of DNase with 50 mM EDTA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, United States), the total RNA was converted to complementary DNA (cDNA) using the Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, United States), following the recommended instructions.

### 2.3. In-silico transcriptional analysis

In-silico prediction of Rho-Independent terminator for each bacteriocin gene was performed using the Findterm tool (<http://softberry.com>) [18].

**Table 1**

Strains and plasmids used in this study.

Strains and plasmids	Source/references
<b>Strains</b>	
<b>Producer strain</b>	
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> CNCM I-5369	[16]
<b>Target strain</b>	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Manassas, VA (USA)
<b>Heterologous producer strain</b>	
<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	Promega, Madison, United States
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Merck Millipore, Burlington, United States
<b>Expression Plasmids</b>	
pT7-6HIS-010	[16]
pT7-6HIS-012	[16]
pT7-6HIS-023	[16]
pT7-6HIS-030	[16]
pT7-6HIS-038	[16]

The putative promoter region of each gene was suggested based on the consensus sequences for -10 box (TATAAT) and -35 box (TTGACA) and considering their position upstream of the start codon.

### 2.4. Primer design

The nucleotide sequences of the bacteriocin genes of *L. paracasei* CNCM I-5369 were previously determined with Bagel 4 software [16]. The house-keeping genes used to standardize the expression of bacteriocin genes were the *gyrA* and 16S *rRNA* genes [19]. The oligonucleotides used for RT-qPCR (Table 2) in this work were designed using the Primer 3 tool (<http://primer3.ut.ee/>). The specificity and the quality of the primer pairs have been verified with NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>).

### 2.5. Quantitative PCR (qPCR) conditions and assessment of gene expression

Each RT-qPCR reaction was performed in triplicate in a final volume of 25 µl, containing 12.5 µl of 2X Brilliant III SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), 1.25 µl of each appropriate primer, 2 µl of cDNA and 8 µl of nuclease free water. The RT-qPCR reactions were performed in the "CFX Connect Real-Time PCR Detection System" thermocycler (BIO-RAD, Hercules, USA) under conditions including an initial step at 95 °C for 10 min followed by 45 cycles of 95 °C for 15 s, 58 °C for 1 min, and 72 °C for 30 s. An additional step starting between 90 °C and 58 °C was performed to establish a melting curve and check the specificity of each primer pair [20]. Threshold cycle (Ct) values for each sample were obtained using Bio-Rad's CFX Manager software. The Ct value is the basis for the calculation of the relative quantification, corresponding to the expression of the target gene compared to the house-keeping gene. The analysis of the relative expression of the target genes was determined using the  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  method [21]. To know the reproducibility of the data, the efficiency was determined according to the following equation  $E = [10^{-1/s} - 1]^{-1} * 100$ , with *s* corresponding to the standard curve obtained from several dilutions of the cDNA [22].

### 2.6. Heterologous production and purification of bacteriocins

Each gene was cloned under the control of the inducible T7 promoter as recently reported [16], using e-Zyvec technology. Each recombinant plasmid (Table 1) was recovered and used to transform the *E. coli* Rosetta (DE3) and *E. coli* BL21 (DE3) competent cells by a heat shock method (42 °C). Briefly, SOC medium (Super Optimal broth with Catabolic repression, Sigma Aldrich, St Louis, USA) was added and the transformed cells were incubated at 37 °C for 1 h with shaking (160 rpm). After overnight growth at 37 °C, the *E. coli* transformants were selected on the LB agar medium supplemented with ampicillin (100 µg/mL) and chloramphenicol (30 µg/mL) (Sigma Aldrich, St Louis, USA). To produce the recombinant bacteriocins, overnight cultures of *E. coli* Rosetta (DE3) and *E. coli* BL21 (DE3) strain harbouring recombinant plasmids were diluted to 1% (vol/vol) in 100 mL LB broth containing ampicillin (100 µg/mL) and chloramphenicol (30 µg/mL) and then were grown aerobically at 37 °C with shaking at 160 rpm until they had reached an OD<sub>600nm</sub> of 0.8. Expression was induced by addition of 0.5 mM (IPTG) isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) and the cells were incubated for an additional 3–5 hours at 37 °C with shaking at 160 rpm.

After production, the cells were recovered by centrifugation (4700 g for 20 min), resuspended in a lysis buffer containing 20 mM TRIS-HCl pH 8 and 300 mM NaCl supplemented with

**Table 2**  
Sequences of oligonucleotide primers used in this study.

Target gene	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')	Theoretical and expected amplicon size (bp)
<i>orf010</i>	AGATCACTGGCGGTTTTGC	GCACCACCAGCAATTCATCT	100
<i>orf012</i>	AGCTTGGAAAAGATTGCTGCT	CAGACTACCAGTAAGCACGC	99
<i>orf023</i>	ACGTAAATTCCTGACAATGCTGA	GCCCTGCCATCCCTTTAAAA	100
<i>orf030</i>	TCCAACGATCAAAGCAGAGC	ACAGCCGTCACATAAGCCCTT	99
<i>orf038</i>	CGGCAGGTATTGGATCAGGA	ACCCAACCGCTCCTAAGTTT	99
<i>gyrA</i>	CTTCCACGCATGATGTCCTG	AATCCCTTTTGGCGTTCGAC	101
16S rRNA	GTAGTGGCAAGCGTTATCC	GATGCGCTTCCTCGGTTAAG	101

10 mM imidazole (W10). Then, the cells were lysed in the cell disruptor (CSL One Shot Machine 2700 bars, CellID, France) by exerting a pressure of 1.035 bar to release the cytoplasmic proteins. Three cycles were repeated for the same method. The lysate was then centrifuged at 11,000 g for 1 h following purification of bacteriocins by Ni-NTA affinity chromatography. To this end, the supernatants were loaded onto a column containing Nickel resin grafted on a nitrilo-tri-acetic (Ni-NTA) matrix (HisPur™ Ni-NTA Spin Columns, 1 mL, de Thermo SCIENTIFIC, Waltham, United States) previously equilibrated with TRIS–HCl buffer (20 mM TRIS–HCl pH8 and 300 mM NaCl). Bacteriocins have a 6-histidine (6-His) tag at their N-terminal site (Table 1). The 6-His tag interacts with Ni<sup>2+</sup> ions, and only the proteins of interest remain attached to the resin. The resin was washed with 16 mL of the same buffer supplemented with 30 mM imidazole and the peptides were eluted with 1 mL of TRIS–HCl buffer supplemented with 400 mM imidazole. A desalting step was performed using PD miditrap columns (GE Healthcare Life Science, Pollard, United Kingdom) to remove the imidazole. The purity is verified by Tricine-SDS-PAGE [23].

### 2.7. Solubilization, separation and detection of bacteriocins

The inclusion bodies were resolubilized with 50 mM TRIS–HCl pH8 buffer containing 4 M urea and incubated for 1.5 h at room temperature with shaking at 160 rpm followed by centrifugation at 11,000 g for 1 h. The resolubilized proteins contained in the supernatant were purified by Ni-NTA chromatography (as described above) to renature the proteins and to isolate those of interest.

The purification steps were analyzed on the Tricine-SDS-PAGE [23]. Samples diluted in Laemmli Buffer [24] were heated at 90 °C for 10 min before loading onto the gel. Migration was performed at a constant voltage of 120 V and initial amperage of approximately 50 mA per gel for 45 min. After migration, the gels were stained with InstantBlue™ (Expedeon, Cambridge, United Kingdom) for 20 min.

The final concentration of each bacteriocin after purification was determined with the BCA (bicinchoninic acid) Assay protein kit (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), as recommended by the supplier.

### 2.8. Mass spectrometry

Mass spectra were obtained with a MALDI-TOF mass spectrometer. The purified bacteriocin contained in the elution fractions, was detected by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS). The analysis was carried out using the Autoflex Speed MALDI TOF/TOF equipment (Bruker Daltonics, Germany) and spectra were obtained using flexAnalysis softwear (Bruker Daltonics, Germany). When required, the samples were concentrated using Pierce™ C18 tips (Thermo Scientific).

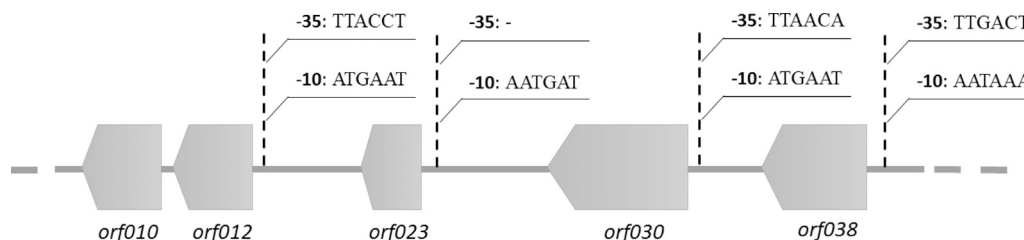
### 2.9. Bacteriocin activity

The antimicrobial activity of the bacteriocins was tested by the agar diffusion test method [25], using *E. coli* ATCC 8739 as the target strain. This strain does not contain the *stx1* or *stx2* genes coding for Shiga toxins [26]. To titrate the antibacterial activity of purified bacteriocins, the serial dilution method on agar medium was used. Thus, purified bacteriocins were acidified to a pH between 4.5 and 5 and sterilized by filtration. Serial double dilutions of the samples were performed and was added to the wells of BHI soft agar containing the *E. coli* ATCC 8739 indicator strain. The Petri dishes were then incubated at 37 °C for 18 h. The antibacterial activity was then determined in Arbitrary Units per millilitre (AU/mL) according to the following formula: 2<sup>n</sup> × (1000 μl/ deposited volume), with n corresponding to the highest number of dilution at which growth inhibition of the sensitive strain is observed [27].

## 3. Results

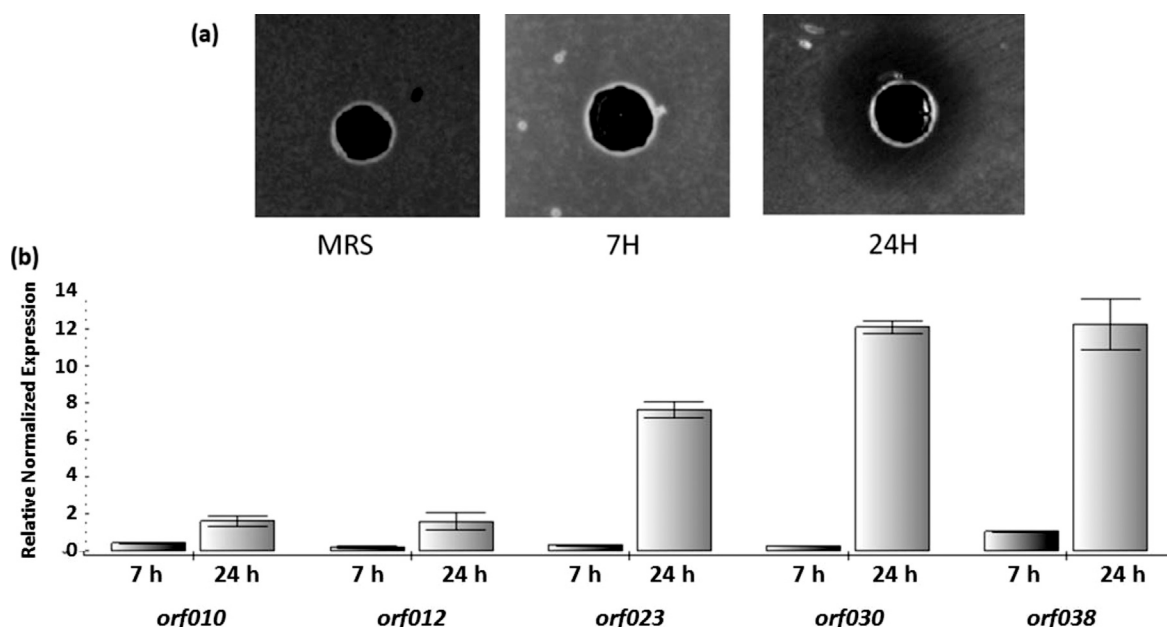
### 3.1. In-silico prediction and locations of putative promoters and terminator regions

The nucleotide and protein sequences for the five bacteriocins of *L. paracasei* CNCM I-5369 strain were identified using Bagel 4 software [16]. The putative sequences of promoter regions are depicted for each gene in Fig. 1. The Rho-independent terminator is based on a palindrome sequence downstream from the target gene. The results of the analysis performed showed no palindrome



**Fig. 1.** In silico prediction of promoter regions for each bacteriocin coding gene. The putative sequences of promoter regions (–10 and –35) are depicted for each bacteriocin gene.





**Fig. 2.** (a) Agar diffusion test against *E. coli* ATCC 8739 using the *Lacticaseibacillus paracasei* CNCM I-5369 supernatant withdrawn after 7 and 24 h of growth. MRS broth, adjusted to pH 5, was used as control. (b) Expression of *orf010*, *orf012*, *orf023*, *orf030* and *orf038* genes coding for five distinct class II bacteriocins in *Lacticaseibacillus paracasei* CNCM I-5369. The black and the grey bars indicate the RT-qPCR data after 7 and 24 h of growth respectively. The error bars represent standard deviation.

sequences, indicating that the termination of these genes is regulated by a Rho-dependent mechanism.

The distance between the *orf012* and *orf010* is very short, (28 nucleotides) and therefore we could not identify any putative promoter sequences for gene *orf010* and terminator sequences for gene *orf012*. These *orfs* could be co-transcribed, and in order, to confirm this hypothesis, we performed a PCR assay using the cDNA of the *L. paracasei* CNCM I-5369 strain as a template, and the primers: *forward primer-orf012* and *reverse primer orf010* (Table 2). We obtained an amplicon of about 300 bp which favourably supported a co-transcription of *orf010* and *orf012* (data not shown).

### 3.2. All genes coding for these five class II bacteriocins are concomitantly expressed in the natural host

The growth of a culture of *L. paracasei* CNCM I-5369 was monitored during 24 h. At the beginning (7 h) and at the end of the logarithmic growth phase (24 h), the culture supernatant was recovered, adjusted to a pH between 4.5 and 5 and tested against *E. coli* ATCC 8739 as a target strain (Fig. 2a). It should be noted that only the supernatant withdrawn at the end of the logarithmic growth phase displayed bioactivity. Of note, this bioactivity was abolished following treatment of the supernatant with proteolytic enzymes like papain and proteinase K at a final concentration of 2 mg/mL, indicating a proteinaceous nature of the molecule(s) responsible of this bioactivity.

At 7 and 24 h of growth, cells were collected and used to study expression of each gene coding for these bacteriocins, using the RT-qPCR method. As indicated in Fig. 2b, genes coding for these five bacteriocin genes were uniquely expressed after 24 h of growth. The RT-qPCR analysis revealed that *orf023*, *orf030* and *orf038* were overexpressed.

### 3.3. Optimization of the production of bacteriocins

Plasmids carrying the bacteriocin genes were used to transform the Rosetta and BL21 *E. coli* strains. Growth of the transformed Rosetta strain was compared with that of the BL21 strain in LB

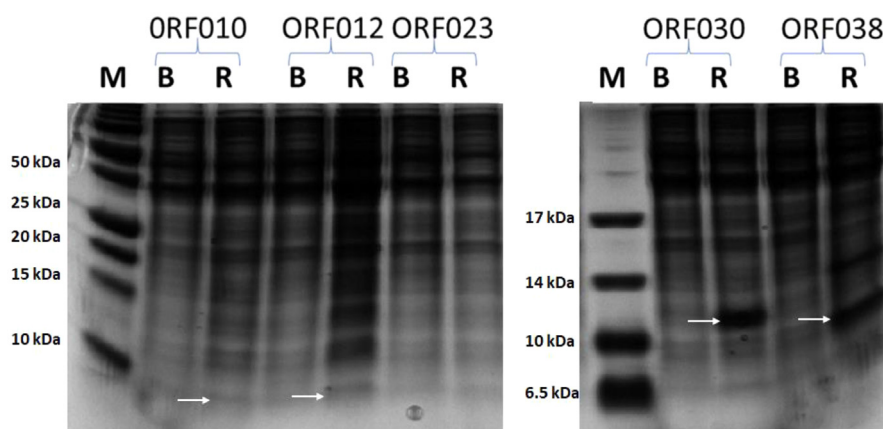
broth. No significant difference in the growth between the strains and the growth rate were observed (data not shown).

The expression of *orf010*, *orf012*, *orf023*, *orf030* and *orf038* was carried out in *E. coli* Rosetta and *E. coli* BL21, by using RT-qPCR method. As shown in Table 3, the expression was remarkable in the *E. coli* Rosetta strain, where the highest production levels were obtained (Fig. 3). Finally, the *E. coli* Rosetta strain was selected to perform the bacteriocin production. The conditions producing the highest bacteriocin yields were observed following induction with 0.5 mM IPTG for 5 h at 37 °C.

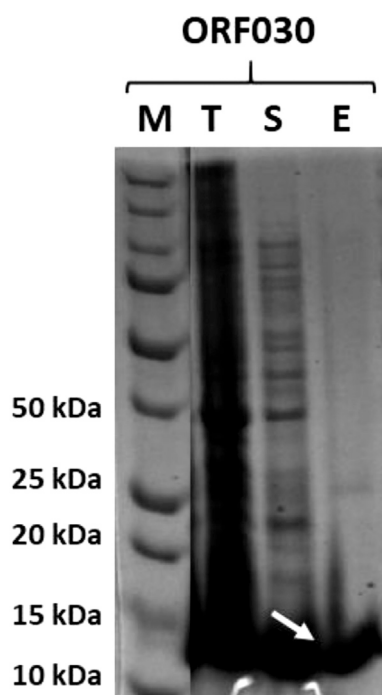
The purification of bacteriocins by Ni-NTA affinity chromatography was monitored by SDS-PAGE. Only the bacteriocin coded by *orf030* was purified under the pre-determined expression condition, as shown on Fig. 4. For the other bacteriocins coded by *orf010*, *orf012*, *orf023* and *orf038*, low concentrations were found in the soluble fraction, suggesting that these bacteriocins were misfolded and forming inclusion bodies (Table 4). To verify this hypothesis, the total fraction was treated with a buffer containing 4 M urea. Then a second Ni-NTA affinity chromatography was performed in order to increase the purification yield. The SDS-PAGE analysis showed that the urea treatment increased the concentration of bacteriocins in the eluted fractions during purification (Fig. 5-A). In addition, bacteriocins were analysed by MALDI-TOF mass spectrometry and the mass spectra of 5 bacteriocins were shown on Fig. 5-B. Thus, a main peak corresponding to the expected  $m/z$  value ( $m/z$  is the mass/charge ratio, where  $z$  is usually 1 and  $m$  corresponds to the molecular weight) of each bacteriocin (8149.1 for ORF010, 8431.1 for ORF012, 5075.2 for ORF023, 14119.4 for ORF030 and 10281.6 for ORF038) was observed.

**Table 3**  
Bacteriocin genes expression levels in *E. coli* Rosetta strain in fold of the level found in BL21 strain.

Genes	Level of expression	P-Value
<i>orf010</i>	12.75	0.15086
<i>orf012</i>	27.98	0.11891
<i>orf023</i>	47.55	0.06880
<i>orf030</i>	144.13	0.15235
<i>orf038</i>	5.54	0.05529



**Fig. 3.** Bacteriocins electrophoretic patterns on SDS-PAGE (12 % polyacrylamide). **M:** Markers of molecular weights, **B:** *E. coli* strain BL21, **R:** *E. coli* strain Rosetta; The arrows indicated the position of each bacteriocin. The molecular weight of each bacteriocin with His-Tag are: 8136.10 Da for ORF010, 8417.59 Da for ORF012, 5035.80 Da for ORF023, 14088.07 Da for ORF030 and 12230.92 Da for ORF038.



**Fig. 4.** Ni-NTA purification (SDS-PAGE with 12 % polyacrylamide) of the bacteriocin encoded by *orf030*. **T:** total fraction; **S:** soluble fraction; **M:** Size markers; **E:** Elution with 400 mM imidazole; The arrows indicated the position of ORF030.

The concentrations of bacteriocins obtained during the purification steps after urea treatment, were quantified with BiCinchoninic acid assay (BCA assay) (Table 5). Then, the bioactivity of each bacteriocin was tested at pH 5 (Fig. 6) and their minimal inhibitory concentrations are given in Table 5. After the desalting step, we noted that concentration of bacteriocin

**Table 4**  
Bacteriocins yields obtained before urea treatment.

Bacteriocin	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )
ORF010	1.02
ORF012	1.23
ORF023	1.27
ORF030	871.15
ORF038	1.36

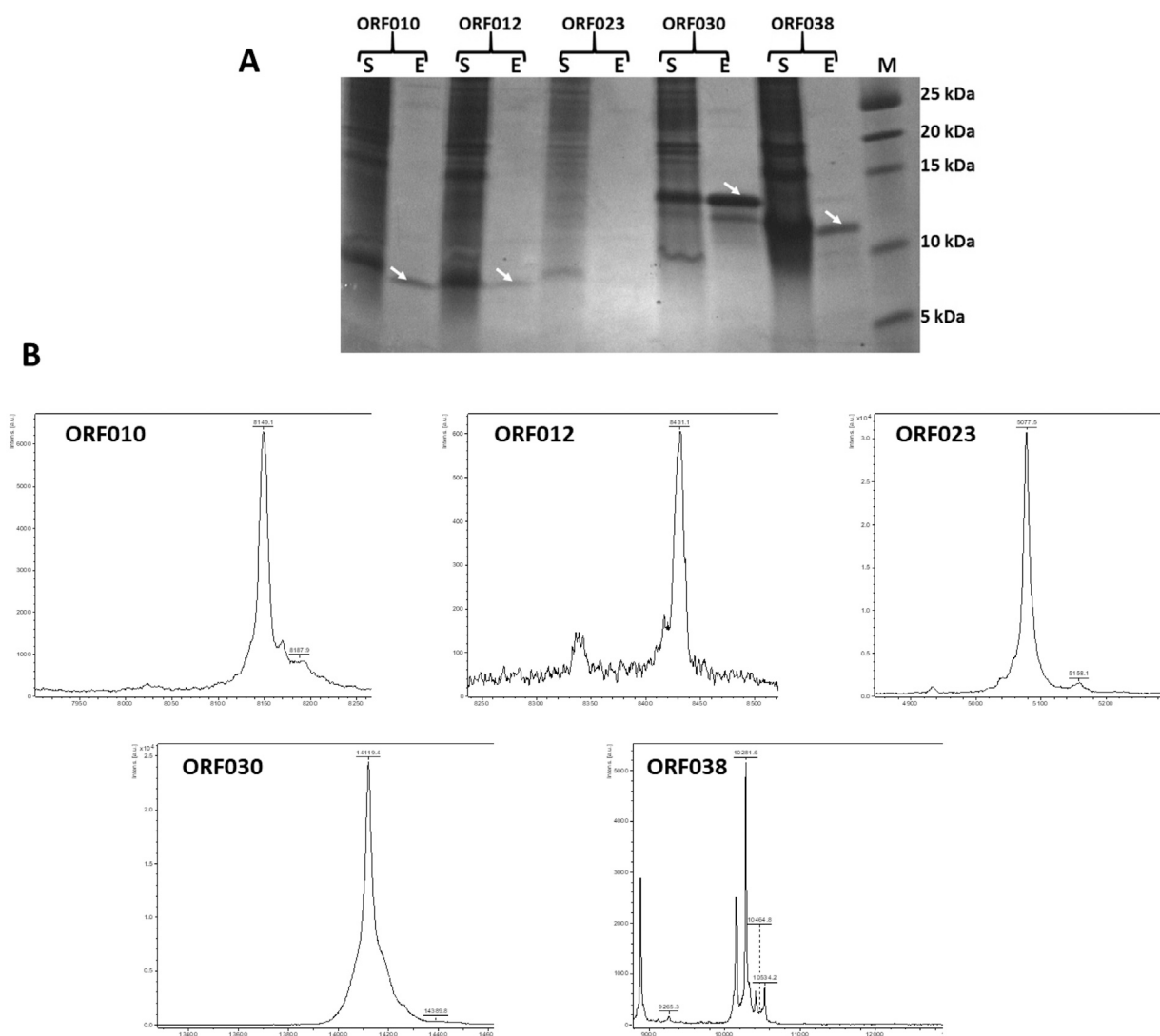
ORF030 was the highest one. All these 5 bacteriocins were active against *E. coli* ATCC 8739. Due to its highest MIC, bacteriocin ORF030 exhibited the lowest specific activity, while bacteriocins ORF010 and ORF012 exhibited the highest one. Importantly, the assessment of antimicrobial activity with all purified bacteriocins revealed a synergistic effect with an improved activity, as depicted on Fig. 6. Consequently, the combination of these 5 purified bacteriocins at 80 mg/mL each, underpinned a significant total activity of 3200 AU/mL. Similarly, the combination of bacteriocins ORF010 and ORF012 also revealed a synergistic interaction (Fig. 6).

#### 4. Discussion

LAB-bacteriocins have gained attention because of their low toxicity, high potency, target specificities [28], and numerous other related biological functions [10,29,30]. LAB-bacteriocins are steadily reported as alternatives for traditional antibiotics especially in light of antimicrobial resistance (AMR), which is a global public problem amplified by the overuse of clinical antibiotics, and the lack of novel drugs in the pipeline. Therefore, demands of new molecules and interventions are urgently required. Currently the death rates are around 750,000 globally and it is expected to rise up till 10 million per year by 2050 with a cumulative cost of US \$ 100 trillion [4]. To face this postulated crisis, AMPs such as bacteriocins can act as efficient strategical plan to alleviate AMR resistance on immediate grounds.

Previously, we have already reported the ability of the multiproducing strain *Lactobacillus paracasei* CNCM I-5369 (now renamed as per new nomenclature of classification *L. paracasei* CNCM I-5369), to produce five distinct class II bacteriocins [16], with activity against *E. coli* strains including those exhibiting resistant to colistin, an antibiotic used as a last-line option to treat infections caused by antibiotic-resistance bacteria such as *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, and *Klebsiella* spp [31]. The multi bacteriocin producing strain expressed activity against *E. coli* only when supernatant was adjusted to pH between 4.5 to 5. Similar results were observed when each bacteriocin was recovered from the insoluble fraction of the heterologous strain *E. coli* Rosetta. The genes *orf010*, *orf012*, *orf023*, *orf030* and *orf038* coding for five putative bacteriocins previously identified [32], were expressed after 24 h of growth, from the multi-bacteriocin producing strain *L. paracasei* CNCM I-5369. The RT-qPCR data reveals the overexpression of the above studied genes. The expression observed at the end of the logarithmic growth phase, was correlated with the bioactivity, delineating a possible link between mRNA stability and production





**Fig. 5.** (A) Ni-NTA purification (SDS-PAGE with 12 % polyacrylamide) of the 5 bacteriocins after urea treatment. **S**: soluble fraction; **M**: Size markers; **E**: Elution with 400 mM imidazole; The arrows indicated the position of each purified bacteriocin.

(B) MALDI-TOF spectra of purified bacteriocins, ORF010, ORF012, ORF023, ORF030 and ORF038. The molecular weight of each bacteriocin with His-Tag are 8149.1 Da for ORF010, 8431.1 Da for ORF012, 5075.2 Da for ORF023, 14119.4 Da for ORF030 and 10281.6 Da for ORF038.

**Table 5**

Molecular weights, concentration and antibacterial activity of the five bacteriocins after urea treatment.

Bacteriocins	Molecular weight <sup>a</sup> (Da)	Concentration (μg/mL)	MIC (μg/mL)	Activity (UA/mL)	Specific activity (UA/μg)
ORF010	8 136.10	21. 3	2.66	800	37.55
ORF012	8 417.59	23.4	2.92	800	34.18
ORF023	5035.80	31.7	3.96	800	25.23
ORF030	14 088.07	317.4	39.67	800	2.52
ORF038	12 230.92	44.7	11.17	400	8.94

<sup>a</sup> The molecular weight of each bacteriocin with His-Tag was reported by Belguesmia *et al.* [16].

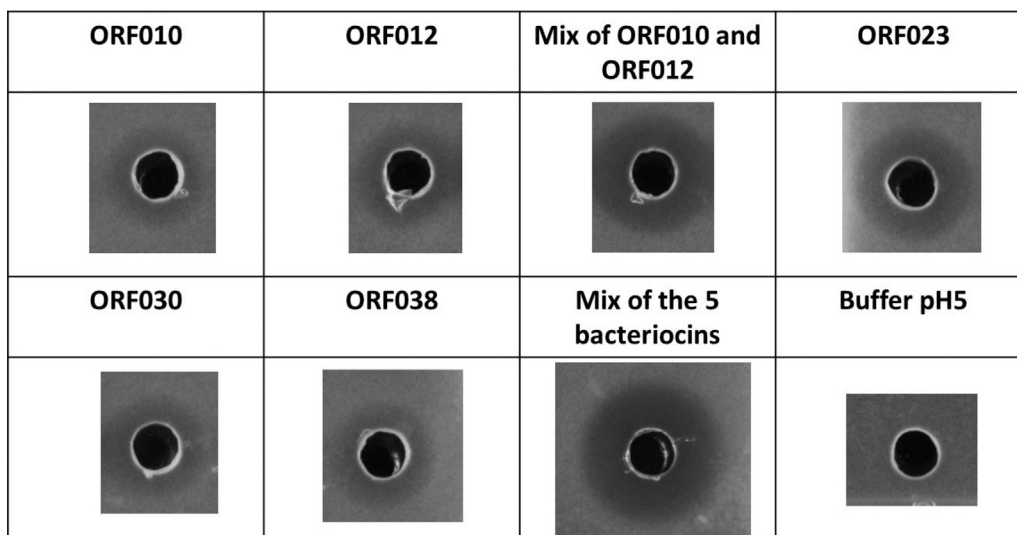
of these bacteriocins, as reported for different regulations systems [20,33,34].

In terms of transcriptional analysis, the *in-silico* analysis performed here enabled us to locate the putative promoters controlling expression of *orf023*, *orf030* and *orf038*. A more detailed *in silico* analysis, revealed a possible common promoter for *orf010* and *orf012*; two *orfs* that were co-transcribed according to our RT-qPCR analysis.

Purification of bacteriocins from the natural hosts are usually tedious and typically only low yields are recovered at the end of the

purification process [35]. The heterologous production of bacteriocins is a more suitable approach as genes coding for these bacteriocins can be placed under inducible promoters and controlled growth conditions allowing the isolation of greater quantities of bacteriocins [36]. Of note, bacteriocins from Gram-positive bacteria can be heterologously produced from synthetic DNA leading as well to larger amounts of bacteriocins than produced by the native host [37].

Here, the expression of each gene was studied in *E. coli* Rosetta DE3 and *E. coli* BL21. Overall, the bacteriocins produced in such a



**Fig. 6.** Agar diffusion test on *E. coli* ATCC 8739 using purified bacteriocins produced by *Escheichia coli* Rosetta strain.

manner have shown a better expression level, when they were produced in *E. coli* Rosetta (DE3), a strain that harbours a plasmid (pRARE) coding rare tRNAs. The analysis of each bacteriocin gene revealed the presence of rare codons (AGG, AGA, CCG, CGA AUA, CUA, CCC, and GGA) which could affect the translation outcome [38]. *E. coli* Rosetta possess the required tRNAs for the codons AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA and ensures efficient translation of the recombinant bacteriocins [39]. In the purification process developed here only the bacteriocin encoded by *orf030* gene was obtained in the soluble fraction, the other ones were recovered from the insoluble fraction. Fahnert et al. [40] reported that overexpression of recombinant proteins can be lethal for the *E. coli* host, yielding to inactive inclusion bodies associated with the specific folding of these proteins [40]. The formation of the inclusion bodies may be an advantage for bacteriocin purification as they can remain protected from the deleterious actions of the host proteases [36]. In addition to these two hypotheses, expression of these bacteriocins in other hosts like lactic acid bacteria, and yeasts could be advantageous.

In this study, the inclusion bodies were solubilized with 4 M of urea. Urea is a chaotrope molecule that at high concentrations can lead to denaturation of the secondary structures of proteins. It is used to inhibit protein aggregation during the folding process, improving the recovery of bioactive proteins [41]. The solubilized inclusion body proteins are refolded by removal of the solubilisation agent. In this study, Ni-NTA affinity chromatography was used for refolding of solubilized proteins.

## 5. Conclusions

The *in-silico* analysis and expression in the native system of the 5 bacteriocin genes of *L. paracasei* CNCM I-5369 strain was studied. Their expression was successfully conducted heterologously using *E. coli* as a host system. Each bacteriocin heterologously produced was purified, characterized by MALDI TOF Mass spectrometry and tested against *E. coli* ATCC 8739. A synergistic activity was observed when these five bacteriocins were tested concomitantly on this target strain.

## Author contributions

Conceptualization, DMM, FC, DD; experimental procedures, DMM; writing—review and editing, DMM, FC DD; supervision FC,

DD; funding acquisition, DD. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

## Funding

This research was funded by La Région des Hauts-de-France, through ALIBIOTECH CPER/FEDER 2016/2021.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare do not have conflict of interest

## Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Stephen W Elson for the critical reading of the manuscript and the English improvement of this manuscript. The MALDI-TOF/MS experiments were performed on the REALCAT platform funded by the French government grant managed by the French National Research Agency (ANR) as part of the "Investments for the Future" program (ANR-11-EQPX-0037). We also acknowledge the Hauts-de-France region, the ERDF, the Ecole Centrale de Lille, and the Foundation Centrale Initiatives for financial support with the acquisition of the REALCAT platform equipment.

## References

- [1] J.M.A. Blair, M.A. Webber, A.J. Baylay, D.O. Ogbolu, L.J.V. Piddock, Molecular mechanisms of antibiotic resistance, *Nat. Rev. Microbiol.* 13 (2015) 42–51, doi:<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3380>.
- [2] B.H. Normark, S. Normark, Evolution and spread of antibiotic resistance, *J. Intern. Med.* 252 (2002) 91–106, doi:<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2796.2002.01026.x>.
- [3] L.F. Chen, T. Chopra, K.S. Kaye, Pathogens resistant to antibacterial agents, *Infect. Dis. Clin. North Am.* 23 (2009) 817–845, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2009.06.002>.
- [4] J.N. O'Neill, *Nat. Rev. Drug Discov.* 15 (2016) 526, doi:<http://dx.doi.org/10.1038/nrd.2016.160>.
- [5] H. Jenssen, P. Hamill, R.E.W. Hancock, Peptide antimicrobial agents, *Clin. Microbiol. Rev.* 19 (2006) 491–511, doi:<http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00056-05>.
- [6] E.M. Kościuczuk, P. Lisowski, J. Jarczak, N. Strzałkowska, A. Józwiak, J. Horbańczuk, J. Krzyżewski, L. Zwierzchowski, E. Bagnicka, Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review, *Mol. Biol. Rep.* 39 (2012) 10957–10970, doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s11033-012-1997-x>.
- [7] K. Naghmouchi, D. Drider, I. Fliss, Action of divergicin M35, a class IIa bacteriocin, on liposomes and *Listeria*, *J. Appl. Microbiol.* 102 (2007) 1508–1517, doi:<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03206.x>.

- [8] M.A. Riley, J.E. Wertz, Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives, *Biochimie* 84 (2002) 357–364, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0300-9084\(02\)01421-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0300-9084(02)01421-9).
- [9] D. Drider, S. Rebuffat, Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications, Springer Science & Business Media, 2011.
- [10] M.L. Chikindas, R. Weeks, D. Drider, V.A. Chistyakov, L.M.T. Dicks, Functions and emerging applications of bacteriocins, *Curr. Opin. Biotechnol.* 49 (2018) 23–28, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.011>.
- [11] S. Soltani, R. Hammami, P.D. Cotter, S. Rebuffat, L.B. Said, H. Gaudreau, F. Bédard, E. Biron, D. Drider, I. Fliss, Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: toxicity aspects and regulations, *FEMS Microbiol. Rev.* 45 (1) (2021), doi:<http://dx.doi.org/10.1093/femsre/fuaa039>.
- [12] Y. Belguesmia, A. Madi, D. Sperandio, A. Merieau, M. Feuilleley, H. Prévost, D. Drider, N. Connil, Growing insights into the safety of bacteriocins: the case of enterocin S37, *Res. Microbiol.* 162 (2011) 159–163, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2010.09.019>.
- [13] L.M.T. Dicks, L. Dreyer, C. Smith, A.D. van Staden, A review: the fate of bacteriocins in the human gastro-intestinal tract: do they cross the gut–blood barrier? *Front. Microbiol.* 9 (2018) 2297, doi:<http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.02297>.
- [14] P.D. Cotter, R.P. Ross, C. Hill, Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.* 11 (2013) 95–105, doi:<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2937>.
- [15] P. Alvarez-Sieiro, M. Montalbán-López, D. Mu, O.P. Kuipers, Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100 (2016) 2939–2951, doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-016-7343-9>.
- [16] Y. Belguesmia, K. Bendjedou, I. Kempf, R. Boukherroub, D. Drider, Heterologous biosynthesis of five new class II bacteriocins from *Lactobacillus paracasei* CNCM I-5369 with antagonistic activity against pathogenic *Escherichia coli* strains, *Front. Microbiol.* 11 (2020), doi:<http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.01198>.
- [17] J.C.D. Man, M. Rogosa, M.E. Sharpe, A medium for the cultivation of lactobacilli, *J. Appl. Bacteriol.* 23 (1960) 130–135, doi:<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>.
- [18] V. Solovyev, A. Salamov, I. Seledtsov, D. Vorobyev, A. Bachinsky, Automatic annotation of bacterial community sequences and application to infections diagnostic, *Proceedings of the International Conference on Bioinformatics Models, Methods and Algorithms (Meta-2011)* (2011) 346–353, doi:<http://dx.doi.org/10.5220/000333703460353>.
- [19] W. Zhao, Y. Li, P. Gao, Z. Sun, T. Sun, H. Zhang, Validation of reference genes for real-time quantitative PCR studies in gene expression levels of *Lactobacillus casei* Zhang, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38 (2011) 1279–1286, doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s10295-010-0906-3>.
- [20] A. Hurtado, C. Reguant, A. Bordons, N. Rozès, Expression of *Lactobacillus pentosus* B96 bacteriocin genes under saline stress, *Food Microbiol.* 28 (2011) 1339–1344, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2011.06.004>.
- [21] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method, *Methods* 25 (2001) 402–408, doi:<http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- [22] C. Beltramo, N. Desroche, R. Tourdot-Maréchal, C. Grandvalet, J. Guzzo, Real-time PCR for characterizing the stress response of *Oenococcus oeni* in a wine-like medium, *Res. Microbiol.* 157 (2006) 267–274, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2005.07.006>.
- [23] H. Schägger, G. von Jagow, Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, *Anal. Biochem.* 166 (1987) 368–379, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2).
- [24] H.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685, doi:<http://dx.doi.org/10.1038/227680a0>.
- [25] J.R. Tagg, A.R. McGiven, Assay system for bacteriocins, *Appl. Microbiol.* 21 (1971) 943.
- [26] *Escherichia coli* ATCC 8739, Complete Genome, (2014). (accessed February 28, 2021) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP000946.1>.
- [27] B. Batdorj, M. Dalgarrondo, Y. Choiset, J. Pedroche, F. Métro, H. Prévost, J.M. Chobert, T. Haertlé, Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag, *J. Appl. Microbiol.* 101 (2006) 837–848, doi:<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02966.x>.
- [28] P.M. O'Connor, T.M. Kuniyoshi, R.P. Oliveira, C. Hill, R.P. Ross, P.D. Cotter, Antimicrobials for food and feed; a bacteriocin perspective, *Curr. Opin. Biotechnol.* 61 (2020) 160–167, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2019.12.023>.
- [29] D. Drider, F. Bendali, K. Naghmouchi, M.L. Chikindas, Bacteriocins: not only antibacterial agents, *Probiotics Antimicrob. Proteins* 8 (2016) 177–182, doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s12602-016-9223-0>.
- [30] S.D. Todorov, H.J. Kang, I.V. Ivanova, W.H. Holzapfel, Bacteriocins from LAB and other alternative approaches for the control of *Clostridium* and *Clostridiodes* related gastrointestinal colitis, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8 (2020), doi:<http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2020.581778>.
- [31] I. Caniaux, A. van Belkum, G. Zambardi, L. Poirel, M.F. Gros, MCR: modern colistin resistance, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 36 (2017) 415–420, doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s10096-016-2846-y>.
- [32] Y. Belguesmia, N. Hazime, I. Kempf, R. Boukherroub, D. Drider, New bacteriocins from *Lactocaseibacillus paracasei* CNCM I-5369 adsorbed on alginate nanoparticles are very active against *Escherichia coli*, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020), doi:<http://dx.doi.org/10.3390/ijms21228654>.
- [33] P. Chanos, T. Mygind, Co-culture-inducible bacteriocin production in lactic acid bacteria, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100 (2016) 4297–4308, doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-016-7486-8>.
- [34] J.A. Renye, G.A. Somkuti, J.I. Garabal, D.H. Steinberg, Bacteriocin production by *Streptococcus thermophilus* in complex growth media, *Biotechnol. Lett.* 38 (2016) 1947–1954, doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s10529-016-2184-2>.
- [35] S. Yildirim, D. Konrad, S. Calvez, D. Drider, H. Prévost, C. Lacroix, Production of recombinant bacteriocin divercin V41 by high cell density *Escherichia coli* batch and fed-batch cultures, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77 (2007) 525–531, doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-007-1188-1>.
- [36] M. Mesa-Pereira, M.C. Rea, P.D. Cotter, C. Hill, R.P. Ross, Heterologous expression of biopreservative bacteriocins with a view to low cost production, *Front. Microbiol.* 9 (2018), doi:<http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.01654>.
- [37] C. Richard, D. Drider, K. Elmorjani, D. Marion, H. Prevost, Heterologous expression and purification of active divercin V41, a class IIa bacteriocin encoded by a synthetic gene in *Escherichia coli*", *J. Bacteriol.* 186 (2004) 4276–4284, doi:<http://dx.doi.org/10.1128/JB.186.13.4276-4284.2004>.
- [38] C.P. Papanephytous, G. Kontopidis, Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in *Escherichia coli*: a general review, *Protein Expr. Purif.* 94 (2014) 22–32, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2013.10.016>.
- [39] N.K. Tripathi, Production and purification of recombinant proteins from *Escherichia coli*, *ChemBioEng Rev.* 3 (2016) 116–133, doi:<http://dx.doi.org/10.1002/cben.201600002>.
- [40] B. Fahnert, H. Lilie, P. Neubauer, Inclusion bodies: formation and utilisation, *Physiological Stress Responses in Bioprocesses: -/-*, Springer, Berlin, Heidelberg, 2004, pp. 93–142, doi:<http://dx.doi.org/10.1007/b93995>.
- [41] A. Singh, V. Upadhyay, A.K. Upadhyay, S.M. Singh, A.K. Panda, Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process, *Microbial Cell Factory* 14 (2015) 41, doi:<http://dx.doi.org/10.1186/s12934-015-0222-8>.

**Chapitre 2 : Etude de la relation structure-activité de la  
lacticaséicine 30**

Study of the structure-activity relationship of lacticasein 30

## RESUME

Dans ce chapitre, nous nous sommes focalisés sur la bactériocine codée par *orf030* renommée lacticaséicine 30, qui rappelons-le, est la bactériocine la mieux exprimée en système hétérologue parmi les cinq bactériocines de *L. paracasei* CNCM I-5369.

La prédiction de sa structure secondaire à l'aide du logiciel I-Tasser (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>) a révélé la présence de cinq hélices- $\alpha$ . Cette prédiction a été confirmée par la technique de dichroïsme circulaire tant à pH 7, qu'à pH 5 (pH dans lequel la bactériocine est active). Par ailleurs, il a été constaté que la proportion d'hélice- $\alpha$  était plus importante à pH 5 qu'à pH 7. De plus, sa structure tridimensionnelle prédite par le logiciel I-Tasser montre un repliement de la bactériocine indiquant des interactions « potentielles » entre ces cinq hélices.

Pour comprendre l'origine de ces interactions, nous avons voulu dans un premier temps identifier les régions impliquées dans l'activité antimicrobienne. Pour cela, différentes formes tronquées de la lacticaséicine 30 ont été générées. Ces formes tronquées consistent en l'expression de la partie N-terminale (N-ter-lacticaséicine 30) qui est supposée contenir les deux premières hélices de la bactériocine, puis l'expression de la partie centrale et C-terminale (C-ter-lacticaséicine 30) qui est supposée contenir les trois dernières hélices et enfin une forme plus courte contenant uniquement la première hélice de la région N-terminale (N-ter-H1-lacticaséicine 30). Les formes tronquées N-ter-lacticaséicine 30 et C-ter-lacticaséicine 30 sont actives contre les bactéries à Gram-négatif, mais aussi contre *Listeria innocua* CIP 80.11 utilisée comme modèle de bactéries à Gram-positif. Néanmoins le peptide C-ter-lacticaséicine 30 perd en activité contre les bactéries à Gram-négatif. Bien que le peptide N-ter-lacticaséicine 30 affiche une activité identique à celle de la forme non tronquée, le peptide N-ter-H1 contenant uniquement la première hélice de la région N-terminale est actif uniquement contre *Listeria*, suggérant ainsi que l'activité anti-Gram-négatif de la région N-terminale nécessite la présence des deux hélices.

La seconde partie avait pour objectifs de créer des mutations spécifiques à l'intérieur des hélices, en remplaçant des acides aminés chargés ou aromatiques par des acides aminés neutres, ou alors en remplaçant une thréonine ou une alanine par la proline afin de déstabiliser l'hélice. Ensuite, les mutants générés ont été testés contre les bactéries à Gram-négatif. Les peptides obtenus par modification de la lacticaséicine 30 sont E6G, T7P, E32G, T33P, T52P, D57G, A74P, Y78S, Y93S et A97P. L'activité contre les bactéries à Gram-négatif des peptides portant les E6G, T7P, D57G, A74P, Y78S, Y93S et A97P est fortement altérée par rapport celle de la lacticaséicine 30, alors que celle des peptides portant les mutations E32G, T33P et T52P est

restée inchangée. Ces résultats montrent que l'acide glutamique 6, la tyrosine 78 et la tyrosine 93 jouent un rôle important dans l'activité contre les bactéries à Gram-négatif. De plus, les substitutions de l'alanine ou de la thréonine par la proline à l'intérieur des hélices 1, 3, 4 et 5 semblent impacter la stabilité de la lacticaséicine 30.

**Publication 3 : Etude de la relation structure-activité d'une  
bactériocine produite par *Lacticaseibacillus paracasei*  
CNCM I-5369 ayant une activité spécifique contre les  
bactéries à Gram-négatif**

Insights into the structure-activity relationships of a  
bacteriocin produced by *Lacticaseibacillus paracasei* CNCM  
I-5369 acting specifically against Gram-negative bacteria

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28

**Insights into the structure-activity relationships of a bacteriocin produced  
by *Lacticaseibacillus paracasei* CNCM I-5369 acting specifically against  
Gram-negative bacteria**

Désiré Madi-Moussa<sup>1</sup>, Yanyan Li<sup>2</sup>, Françoise Coucheney<sup>1</sup>, Sylvie Rebuffat <sup>2</sup>,  
Djamel Drider <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> UMR Transfrontalière BioEcoAgro 1158, Univ. Lille, INRAE, Univ. Liège, UPJV, YNCREA,  
Univ. Artois, Univ. Littoral Côte d’Opale, ICV – Institut Charles Viollette, F-59000 Lille,  
France

<sup>2</sup> Laboratory Molecules of Communication and Adaptation of Microorganisms (MCAM, UMR  
7245 CNRS-MNHN), National Museum of Natural History (MNHN), CNRS, CP 54, 57 rue  
Cuvier 75005, Paris, France

**Running Title:** Study of the structure-activity relationship of the lacticaseicin 30 bacteriocin

**Keywords:** *Escherichia coli*, antimicrobial activity, structure-activity relationship, helical  
conformation,



29 **Abstract**

30 *Lacticaseibacillus paracasei* CNCM I-5369 has a potential to inhibit the growth of problematic  
31 bacteria, including Gram-negative bacteria such as *Escherichia coli* strains resistant to colistin.  
32 This inhibition is exerted through the concomitant production of five bacteriocins encoded by  
33 *orf010*, *orf012*, *orf023*, *orf030* and *orf038*. In this work, we focused on the 111-amino acid  
34 bacteriocin encoded by *orf030* that was formerly designed as bacteriocin ORF030, and hence  
35 named as lacticaseicin 30. Prediction of the lacticaseicin 30 structure using I-Taser tool revealed  
36 a largely helical structure, which was confirmed by a circular dichroism spectroscopy study. To  
37 identify the structural requirements of the lacticaseicin 30 activity directed against Gram-  
38 negative bacteria, series of variants, either shortened or containing point mutations, were  
39 heterologously produced in *Escherichia coli* and assayed for their antibacterial activity against  
40 a panel of Gram-negative bacteria and against the Gram-positive *Listeria innocua*. Of note,  
41 variant peptides comprising either the N-terminal region (amino acids 1 to 39), the central and  
42 C-terminal regions (amino acids 40 to 111) were prepared. Furthermore, mutations were  
43 introduced by site-directed-mutagenesis to obtain ten peptide variants E6G, T7P, E32G, T33P,  
44 T52P, D57G, A74P, Y78S, Y93S and A97P. Compared to lacticaseicin 30, the anti-Gram-  
45 negative activity of the N-terminal peptide and of variants E32G, T33P, and D57G remained  
46 almost unchanged, while that of the C-terminal peptide and variants E6G, T7P, T52P, A74P,  
47 Y78S, Y93S and A97P was significantly altered. Finally, the N-terminal region was further  
48 shortened to keep only the first 20 amino acid part that was predicted to include the first helix.  
49 The anti-Gram-negative activity of this truncated peptide was then completely abolished.  
50 This study shows that lacticaseicin 30, which is a bacteriocin produced by *Lacticaseibacillus*  
51 *paracasei* CNCM I-5369; is active against Gram-negative bacteria, in a pH-dependent manner,  
52 and at least two helices are necessary for this activity. This study shows as well that C-terminal  
53 region carries amino-acids playing a key role in the anti-Gram-negative activity.

## 54 **Introduction**

55 Antibiotic crisis, which is endangering the efficacy of antibiotics, is now well acknowledged  
56 worldwide as a serious health problem. Antibiotics which enabled to save millions of lives in  
57 the world since their discovery are now facing a rapid resistance, which decrease significantly  
58 their efficacy. The reasons usually reported to explain such situation include the overuse and  
59 misuse of conventional antibiotics, as well as their inappropriate prescription. Moreover,  
60 possibilities to refill the antibiotic-pipeline are very limited in the near future due to reduced  
61 economic incentives offered to the major pharmaceutical companies (1, 2). In 2014, Lord Jim  
62 O’Neill and his team published a review, in which they estimated that antimicrobial resistance  
63 (AMR) could cause 10 million deaths per year by 2050 (3). This alert has then been quoted  
64 repeatedly and became a refrain for different media, experts, and public health agencies to raise  
65 public’s awareness on the burden associated with antimicrobial resistance. To face this  
66 overwhelmed situation, our focus must shift to alternative therapies for treating bacterial  
67 infections. Related to that, numerous alternatives to antibiotics exist and include bacteriophage  
68 therapy (4, 5), predatory bacteria (6), competitive exclusion of pathogens (7) including  
69 bacteriocins (8–10). These approaches offer clearly advantages such as their specificity and low  
70 detrimental impact on beneficial microbial communities, unlike antibiotics which generally  
71 have collateral damages on the commensal bacteria (11).

72 Bacteriocins are ribosomally synthesized antimicrobial peptides produced by Gram-  
73 positive and Gram-negative bacteria as well as by Archaea (12,13). Bacteriocins exhibit  
74 extensive variations in their molecular weights, inhibitory spectra, modes of action, and  
75 mechanisms of biosynthesis, export and self-protection of the producing strains (14). These  
76 antimicrobial peptides are considered as significant actors of microbial competitions because  
77 of their role in colonizing niches, killing competing strains and using cross-talk or quorum-  
78 sensing networks within bacterial communities (15–17).

79 Gram-positive bacteriocins are predominantly produced by lactic acid bacteria (LAB).  
80 These bacteriocins, referred here as LAB-bacteriocins, are safe towards Eukarya cells (18, 19).  
81 They can show narrow spectra of activity, acting therefore selectively on members of the same  
82 or closely related species, or broad spectra when targeting other species (20, 21). During the  
83 last years, several classifications of LAB-bacteriocins have been proposed (16, 22, 23). Among  
84 them, the classification proposed by Alvarez-Sieiro et al. (23), dividing LAB-bacteriocins into  
85 three main classes, is largely used. According to this classification the class I of bacteriocins  
86 includes peptides that have undergone post-translational modifications during their  
87 biosynthesis, resulting in the introduction of rare amino acids (such as lanthionine). Class II  
88 includes unmodified bacteriocins having lower molecular weights (<10 kDa), while class III  
89 contains thermo-labile unmodified bacteriocins of more than 10 kDa with a bacteriolytic or  
90 non-lytic mechanism of action (22). Depending on their structural and functional  
91 characteristics, many LAB-bacteriocins act on the cytoplasmic membrane of target bacteria by  
92 forming pores, leading to the leakage of ions and small molecules, or by degrading the cell wall.  
93 With continuing research, LAB-bacteriocins have been allocated with further functions such as  
94 antiviral activity and inhibition of proliferation of unscheduled and unregulated tumor cell line  
95 (16, 24). Gram-negative bacteria are generally resistant to LAB-bacteriocins due to their outer  
96 membrane which confers protection against hydrophobic macromolecules (25,26).  
97 Nonetheless, a limited number of LAB-bacteriocins possessing activity against Gram-negative  
98 bacteria, including *Escherichia coli* has been reported in the literature (27–30). But if the mode  
99 of action of LAB-bacteriocins against Gram-positive bacteria is globally well documented (8,  
100 31), that exerted against Gram-negative bacteria remains poorly understood. Here, we focused  
101 on *Lactocaseibacillus paracasei* CNCM I-5369, a strain isolated from an Algerian dairy product  
102 and recently shown to produce five class II bacteriocins endowed with activity at pH 5 against  
103 Gram-negative bacteria including *E. coli* resistant to colistin (30). Moreover, we have

104 heterologously produced each of these bacteriocins, which are encoded by *orf010*, *orf012*,  
105 *orf023*, *orf030* and *orf038*. The bacteriocin encoded by *orf030*, here referred as lacticaseicin  
106 30, was obtained in large quantities in the soluble fraction, contrarily to the other produced  
107 peptides (32) and was shown to exhibit a potent activity against *E. coli*.

108 In this study, the structure activity relationship of lacticaseicin 30 was investigated. For  
109 this purpose, the predicted secondary structure of this bacteriocin, which includes five helices  
110 distributed over the 111 amino acid sequence, was used to design a series of variants, exhibiting  
111 either truncated sequences including one helix, two helices or three helices, or specific point  
112 mutations. All lacticaseicin 30 variants were assessed for their anti-Gram-negative activity.

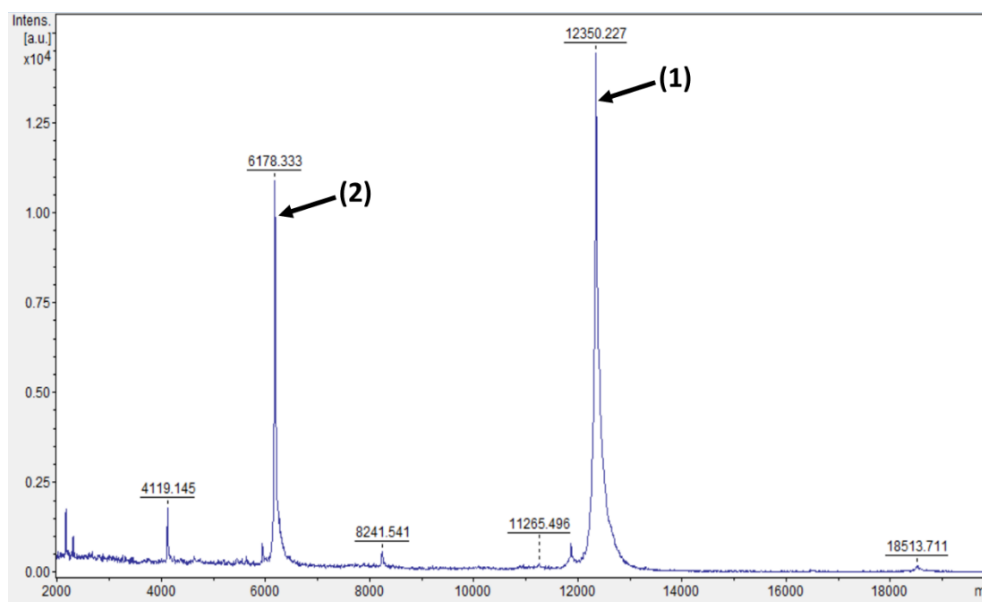
113

## 114 **Results**

### 115 **Heterologous expression and partial characterization of lacticaseicin 30**

116 The pT7-6his-030 plasmid (30) was transferred to *E. coli* Rosetta strain. Then, production of  
117 lacticaseicin 30 was induced by addition of isopropylthio- $\beta$ -galactoside (IPTG) and purified by  
118 Ni-NTA chromatography. Finally, the 6his-tag was removed using TEV-Protease. The purified  
119 bacteriocin was analysed by MALDI-TOF/MS, as shown on **Figure 1**. The most intense peak  
120 (12,350.227) corresponds to the expected m/z value, (m/z is the mass/charge ratio) where z is  
121 equal to 1 and m corresponds to the molecular weight of lacticaseicin 30. The second main peak  
122 (6178.333) probably corresponds to the lacticaseicin 30 m/z value when z=2. The molecular  
123 weight obtained in the MALDI-TOF spectrum correlates to the theoretical molecular weight  
124 determined with ExPASy tool (<https://web.expasy.org/protparam>), which was 12339.17 Da.  
125 Furthermore, the theoretical molecular weight / the observed molecular weight ratio of  
126 lacticaseicin 30 suggested that this bacteriocin did not undergo maturation during its  
127 biosynthesis. The antimicrobial activity of the purified lacticaseicin 30 was tested, with and  
128 without the 6his-tag, at pH5 and their MICs were determined using *E. coli* ATCC 8739 as the

129 target strain. Thus, lacticaseicin 30 displayed a same MIC value of 40  $\mu\text{g/ml}$ , with and without  
130 the 6his-tag. The absence of a leader peptide sequence at the N-terminal region and maturation  
131 steps argues on a possible leaderless nature of lacticaseicin 30 and its affiliation to class IIc.  
132

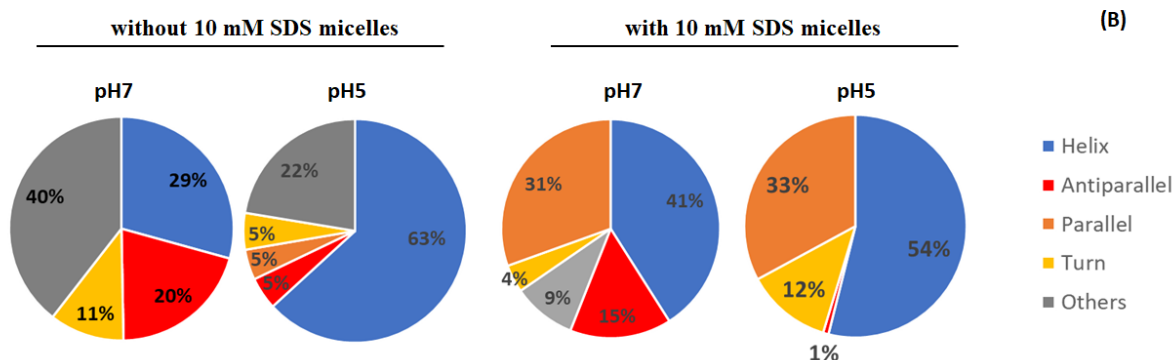
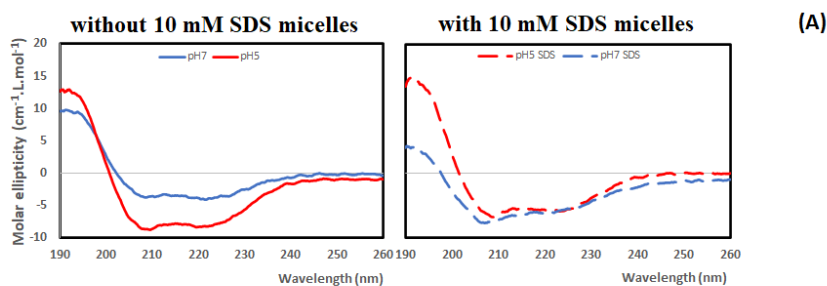


133 **Figure 1:** MALDI-TOF spectra of Lacticaseicin 30 without 6his-tag. Its molecular weight is 12350.227  
134 Da. The most intense peak (1) corresponds to the expected m/z value, where z is equal to 1 and m  
135 corresponds to the molecular weight of Lacticaseicin 30 (12350.227 Da). The second main peak (2)  
136 probably corresponds to the Lacticaseicin 30 m/z value when z=2.  
137  
138

### 139 **Structural analyses of the lacticaseicin 30**

140 The secondary and three-dimensional (3D) structures of lacticaseicin 30 were predicted using  
141 the I-Tasser software. As seen on **Figure 2**, the predicted secondary structure of lacticaseicin  
142 30 is characterized by the presence of five  $\alpha$ -helices over the whole 111 amino acid sequence.  
143 The prediction of the 3D-structure revealed a folding with potential interactions between these  
144 five distinct  $\alpha$ -helices (**Fig. 2**). This largely helical structure was then confirmed by a circular  
145 dichroism (CD) study. Lacticaseicin 30 secondary structure was analyzed by CD spectroscopy,  
146 at pH7 and pH5, in the presence or absence of sodium dodecyl sulfate (SDS) micelles used as  
147 a model of anionic membrane bilayer (33). The CD spectra showed that the lacticaseicin 30  
148 adopts a helical structure at both pH5 and pH7, in the presence or absence of SDS micelles





160  
 161 **Figure 3:** (A) Circular dichroism spectra of Lacticaseicin 30 at pH7 (blue) and pH5 (red). All spectra  
 162 were recorded with and without 10 mM SDS micelles. (B) The secondary structure content (%) of  
 163 Lacticaseicin at pH7 and pH5, was predicted using the BestSel Software.  
 164

### 165 **Design of lacticaseicin 30 variant-peptides**

166 Variant-peptides designed and constructed prompted us to locate part of lacticaseicin 30, which  
 167 is involved in the anti-Gram-negative activity; an activity which is rarely reported for LAB-  
 168 bacteriocins. To this end, the DNA coding for the N-terminal region carrying first two helices  
 169 (from Met1 to Asp39), central or C-terminal regions carrying the last three helices (from Glu40  
 170 to His111) was cloned into the pET-32b plasmid, leading to the variant-peptide named N-ter-  
 171 lacticaseicin 30 and C-ter-lacticaseicin 30, respectively. Of note, a shortened N-terminal region  
 172 carrying only the first  $\alpha$ -helix (from Met1 to Thr20), designed as N-ter-H1-lacticaseicin 30, was  
 173 as well expressed in this system, considering nonetheless that thioredoxin (TRX) and 6his-tags  
 174 located upstream of the muticloning site improve solubility of the variant-peptides and their  
 175 purification by the Ni-NTA chromatography.

176 In addition, several mutants were generated by site-directed mutagenesis, in order to identify  
 177 the amino acids, which are potentially playing a role in the anti-Gram-negative activity. To this  
 178 purpose, charged (Glu, Asp) or aromatic (Tyr) amino acids located inside of each  $\alpha$ -helix were

179 replaced by an uncharged amino acid (Gly, Ser). Furthermore, amino acids located in the center  
180 of each helix were substituted by a proline in order to disrupt the  $\alpha$ -helix and induce a  
181 modification of the structural conformation of the peptide.

182

### 183 **The N-terminal region is sufficient to exert anti-Gram-negative activity**

184 After being produced, purified, quantified, the lacticaseicin 30 bacteriocin and its variants either  
185 N-ter-lacticaseicin 30, C-ter-lacticaseicin 30 and N-ter-H1-lacticaseicin 30, were assessed for  
186 their antibacterial activity, which was determined, at pH5, against different Gram-negative  
187 bacteria and *L. innocua* CIP 80.11 as Gram-positive bacterium (**Table 1**). Therefore,  
188 lacticaseicin 30 exhibited activity against all these target bacteria (**Table 1**), particularly against  
189 *E. coli* ATCC 8739 and *P. vulgaris* ATCC 33420, which MIC values resulted to be the lowest  
190 ones (40  $\mu\text{g/ml}$ ), conversely to that obtained against *P. aeruginosa* ATCC 27853 (160  $\mu\text{g/ml}$ ).  
191 The antibacterial activity against Gram-negative bacteria was clearly proven and depends on  
192 the target strain. Remarkably, the shortened variant-peptides, either N-ter-lacticaseicin 30 or C-  
193 ter-lacticaseicin 30, exhibited activity against the aforementioned Gram-negative target  
194 bacteria, as well as against the Gram-positive *L. innocua* CIP 80.11. Although the MIC values  
195 obtained with the N-ter-lacticaseicin 30 and C-ter-lacticaseicin 30 variant-peptides revealed  
196 that the N-terminal region of lacticaseicin 30 appeared to be sufficient for the anti-Gram-  
197 negative activity, whereas that of the truncated N-terminal peptide N-ter-H1-lacticaseicin 30  
198 was fully abolished, arguing that the first helix of N-terminal part was insufficient for anti-  
199 Gram-negative activity.



200 **Table 1:** Determination of the MICs ( $\mu\text{g/ml}$ ) of truncated forms of Lacticaseicin 30 and its  
 201 truncated forms.

Peptides	<i>E. coli</i> ATCC 8739	<i>Salmonella</i> Newport ATCC 6962	<i>P. vulgaris</i> ATCC 33420	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>L. innocua</i> CIP 80.11
Lacticaseicin 30	40	80	40	160	100
N-ter_Lacticaseicin 30	40	80	40	320	100
C-ter_Lacticaseicin 30	160	160	160	320	100
N-ter-H1_ORF030	-	-	-	-	100

202 **(-) Absence of activity**

203 Abbreviations of target bacteria used here. *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar Newport ATCC  
 204 6962 (*Salmonella* Newport 6962), *Escherichia coli* ATCC 8739 (*E. coli* ATCC 8739), *Proteus vulgaris*  
 205 ATCC 33420 (*P. vulgaris* ATCC 33420), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (*P. aeruginosa* ATCC  
 206 27853), *Listeria innocua* CIP 80.11 (*L. innocua* CIP 80.11)

207

208 **Critical amino acids critical involved in the anti-Gram-negative activity of lacticaseicin 30**

209 Different variant-peptides of lacticaseicin 30 were generated by site-directed-mutagenesis using  
 210 the pT7-6his-030 plasmid. These substitutions were performed in regions expected to play a  
 211 key role in the folding of this bacteriocin. Importantly, these amino-acids substitutions were  
 212 introduced in the middle of each  $\alpha$ -helix in order to induce a conformational structural change.  
 213 Thus, charged amino acids like glutamic acid or aromatic amino-acids like tyrosine were  
 214 replaced by uncharged amino acids like glycine or serine, or by proline known for its role in  
 215 breaking or introducing kinks in helices, due to the lack of amide proton (34).

216 As depicted on Table 2, the antibacterial activity of lacticaseicin 30 and its associated variants  
 217 was measured against different Gram-negative bacteria (Table 2). Overall, amino acids  
 218 substituted led to a decrease in the antibacterial activity, except for E32G, T33P and D57G  
 219 peptides, which MIC values remained unchanged and similar to that of the lacticaseicin 30  
 220 (Table 2). For E32G and T33P, the mutations are located in the N-terminal part, and for tD57G,  
 221 the mutation is located in the C-terminal part (Table 2). These results suggest that glutamic  
 222 acid 6, tyrosine 78 and tyrosine 93 are likely key elements in the anti-Gram-negative activity.  
 223 Noteworthy, the substitution of alanine or threonine by a proline inside of helices 1, 3, 4 and 5

224 appeared to impact their stability, as a decrease of the antibacterial activity was registered  
 225 (Table 2).

226 **Table 2:** Variants peptides issued from Lacticaseicin 30 and their Minimum Inhibitory  
 227 Concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ )

Peptide	Sequence					
L-30	MTDKRETLMMSLSKAYANPTIKAEPALRALIETNAKKVDEGDDEKAYVTAVTQLSHDISKYLIHHAVPEELVAVFNYIKKDVPAADIDAARYRAQALAAGLVAIPIVWGH					
		$\alpha$ -Helix	Coils	mutated amino acids		
Peptides	Original codon	Mutated codon	<i>E. coli</i> ATCC 8739	<i>Salmonella</i> Newport ATCC 6962	<i>P. vulgaris</i> ATCC 33420	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
L-30	-	-	40	80	40	100
E6G	Glutamic acid 6 (GAA)	glycine (GGA)	100	160	100	400
T7P	Threonine 7 (ACT)	proline (CCT)	60	160	60	200
E32G	Glutamic acid 32 (GAA)	glycine (GGA)	40	80	40	100
T33P	Threonine 33 (ACC)	proline (CCC)	40	80	40	100
T52P	Threonine 52 (ACT)	proline (CCT)	70	140	70	200
D57G	Aspartic acid 57 (GAC)	glycine (GGC)	40	80	40	100
A74P	Alanine 74 (GCC)	proline (CCC)	100	160	100	200
Y78S	Tyrosine 78 (TAC)	serine (TCC)	100	200	100	400
Y93S	Tyrosine 93 (TAT)	serine (TCT)	70	140	70	200
A97P	Alanine 97 (GCC)	proline (CCC)	60	100	60	200

228 **L-30 : lacticaseicin 30**

229

## 230 Discussion

231 Antimicrobial peptides (AMP), including bacteriocins are, which exhibit potent and wide  
 232 spectrum of antimicrobial activity. Overall, the presence of positive charges and hydrophobic  
 233 residues constitutes a common trait of AMP. In terms of mode of actions, AMP, including

234 bacteriocins, act as potent antibiotic by causing pores in the cell-wall, altering the microbial  
235 metabolic pathways or inhibiting DNA/RNA/protein synthesis (35–38).

236 Bacteriocins can be bacteriostatic or bactericidal, induce a rapid killing effect and display a  
237 lower propensity to develop resistance than do conventional antibiotics (10, 20, 39, 40). Overall,  
238 the mode of action of LAB-bacteriocins against Gram-positive, and on liposomes model, is well  
239 studied (8, 31).

240 Nonetheless, LAB-bacteriocins with activity against Gram-negative bacteria are reported in  
241 limited reported (27, 28, 30), but their mode of action remains to be fully understood.

242 We have recently isolated and characterized the inhibitory spectrum of *L. paracasei* CNCM I-  
243 5369, a strain isolated from an Algerian dairy product capable to produce five distinct class II  
244 bacteriocins active only at pH 5 against Gram-negative bacteria including *E. coli* resistant to  
245 colistin (30). Here, only one of these bacteriocins, viz lacticaseicin 30 was used as a model to  
246 decrypt this unusual activity. Its antibacterial activity results from the combined action between  
247 the peptide and an acidic pH (pH5) (30, 32). According to the classification proposed by  
248 Alvarez-Sieiro (23), lacticaseicin 30 appeared to meet characteristics of class IIc bacteriocins.

249 Of note, this bacteriocin is synthesized without a leader sequence, and do not undergo post-  
250 translational modifications, suggesting its could be a novel leaderless bacteriocin. Pérez-Ramos  
251 et al. (41) reported that leaderless bacteriocins disrupt the cell membrane of the target bacteria  
252 and most of them do not require any docking molecule for their antimicrobial activity. It was  
253 observed that the lacticaseicin 30 has more negatively charged residues (aspartate and  
254 glutamate) than positively charged residues (Arginine and lysine) and its isoelectric point (pI)  
255 was 6.05. This type of AMPs was yet reported (42, 43). At a neutral pH (pH > pI), the peptide  
256 is anionic while at an acidic pH (pH < pI), the peptide is cationic. Furthermore, it contains many  
257 hydrophobic residues. As previously mentioned, hydrophobic and cationic residues are the  
258 main characteristics of AMPs, and the presence of cationic residues can mediate interactions

259 with negatively charged bacterial lipids, while the hydrophobic residues could degrade the  
260 membrane (44).

261 Of note, Lacticaseicin 30 contains 111 amino-acids

262 (MTDKRETLMSMLSKAYANPTIKAEPALRALIETNAKKVDEGDDEKAYVTAVTQLSHDISKYLLIH  
263 HAVPEELVAVFNYIKKDVPAADIDAARYRAQALAAGLVAIPIVWGH) and structured onto 5  
264 distinct helices, as shown in bold characters, based on the I-Taser tool analysis and circular  
265 dichroism spectroscopy assays performed in the presence of SDS micellar solutions either at  
266 pH 5 or pH 7 (Fig. 3).

267 As indicated on Table 1, the activity towards Gram-negative target bacteria appeared to be  
268 exerted in a strain-dependent manner. Regarding the activity against Gram-negative target  
269 bacteria, it is to note the increase of MICs with the shortened peptide carrying the C-terminal  
270 region of lacticaseicin 30, in comparison with the unmodified peptide (Table 1). Accordingly,  
271 the antibacterial susceptibility has decreased 4-fold against *E. coli* ATCC 8739, 2-fold against  
272 *Salmonella enterica serovar* Newport ATCC 6962 and *Proteus vulgaris* ATCC 33420.  
273 Remarkably, these shortened analogs displayed a same activity against *Pseudomonas*  
274 *aeruginosa* ATCC 27853.

275 It is worthy to note, that assays performed on different *E. coli* strains carrying or not  
276 modifications on their LPS were conducted with novel bacteriocin including thereof the class  
277 II lacticaseicin 30 (30), and data obtained did not permit to designate LPS as the main target of  
278 these novel class II bacteriocins.

279 Nonetheless, the activity against *Listeria innocua* CIP 80.11, used as Gram-positive target strain  
280 remained unchanged. These data indicate the pivot role of the C-terminal region, which had the  
281 effect in reducing the antibacterial activity. This study showed high consistency with various  
282 studies underpinning the role of C-terminal region of bacteriocins. Related to that, Van Kraaij  
283 *et al.* (45), showed that pore formation by nisin involves a translocation of its C-terminal region

284 across the membrane. Then, Johnsen *et al.* (46) revealed the pivot role of the C-terminal region  
285 of pediocin-like bacteriocins (class IIa bacteriocin) in determining their antibacterial spectrum;  
286 a characteristic that was then confirmed for the class IIa divercin VR41 (47). Contrarily to the  
287 aforementioned bacteriocins, lacticaseicin 30 is active against Gram-negative bacteria.

288 To gain more insights on the antibacterial activity of lacticaseicin 30, another analog was  
289 synthesized and consisted in expression and production of a more shortened N-terminal part  
290 carrying only amino-acids from 1 to 20 and one predicted  $\alpha$ -helix  
291 (MTDKRETLMSMLSKAYANPT), and designed as N-ter-H1-lacticaseicin 30. As indicated on  
292 **Table 1**, the antibacterial activity remained unchanged against the Gram-positive target strain,  
293 whereas it was completely abolished against the Gram-negative target bacteria. This result that  
294 at least two  $\alpha$ -helices from the N-terminal region are requested to act against Gram-negative  
295 bacteria. Furthermore, substitutions of amino-acids have been performed, by site-directed  
296 mutagenesis, in the primary sequence of lacticaseicin 30 with the aim to understand their role  
297 on the global antibacterial activity. Site-directed mutation refers to the redesign of natural  
298 antimicrobial peptides by adding, deleting or replacing one, or several amino acid residues (48).

299 Therefore, two type of key mutations have been created. The first consisted to replace glutamic  
300 acid, aspartic acid or tyrosine by glycine or serine, the second consisted to replace threonine or  
301 alanine by proline. These mutations have been created inside of each predicted  $\alpha$ -helix structure.

302 Then, these variant-peptides designed E6G, T7P, D57G, A74P, Y78S, Y93S, A97P, E32G,  
303 T33P and T52P were tested for their activities against the listed target Gram-negative bacteria.

304 As indicated on **Table 2**, these variant-peptides exhibited overall a loss in the antibacterial  
305 activity excepted for E32G, T33P and T52P which anti-Gram-negative activity remained  
306 unchanged.

307 Proline is a typical non-polar amino acid. Proline-rich AMPs act differently from other AMPs.  
308 Indeed, they get into the bacterial cytoplasm through the inner membrane transporter SbmA  
309 instead of killing bacteria through membrane disruption (49). Subsequently, once in the  
310 cytoplasm, proline-rich AMPs target ribosomes and block the binding of aminoacyl-tRNA to  
311 peptidyltransferase center, and interfere with protein synthesis (50). In the case of the  
312 lactacaseicin 30 used here, and which is devoid of proline residues, the substitution by T7, T52,  
313 A74 and A97 by prolines decreases the activity of the corresponding peptides. Indicating that  
314 the mechanism implied in the anti-Gram-negative activity of the lactacaseicin 30 is perturbed  
315 by the introduction of the proline.

316 On the other hand, the R group of glycine is generally classified as a non-polar amino acid in  
317 biology. Glycine-rich AMPs widely exist in nature (51, 52). These peptides contain 14% to  
318 22% glycine residues, which have an important effect on the secondary structure of the peptide  
319 chain.

320 To sum up, lactacaseicin 30 adopts a secondary structure characterized by five  $\alpha$ -helices. The  
321 generation of derivative-peptides, carrying a single mutation, or truncated, enabled to show  
322 some amino acids playing a role in the structure of lactacaseicin 30 and consequently in its  
323 activity against Gram-negative bacteria. Moreover, this study permitted to establish that a least  
324 two-helices are required to undergo anti-Gram-negative activity. These promising  
325 achievements open a new avenue in the characterization of LAB-bacteriocins endowed with  
326 activity against Gram-negative bacteria. Nevertheless, further experiments based on the use of  
327 directed or random mutagenesis, are scheduled for the near future with the aim to provide  
328 variants with enhanced anti-bacterial activity.

## 329 Experimental procedures

### 330 Bacterial strains, plasmids and culture conditions

331 Bacterial strains and plasmids used in this work are listed in **Table 3**. *E. coli* strains were grown  
 332 in Luria-Bertani (LB) broth (53) at 37°C with shaking at 160 rpm and when necessary  
 333 ampicillin at 100 µg/mL (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) was added to the medium. Strains  
 334 used as target organisms to assess antibacterial activity were cultivated, without shaking, in  
 335 Brain Heart Infusion (BHI, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) medium at 37C for 12-18  
 336 h before use.

337 **Table 3.** Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strains and Plasmids	Relevant characteristics	References
<b>Strains</b>		
<b>Strains used for heterologous expression and cloning</b>		
<i>Escherichia coli</i> JM109	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, l-, A(iac-proAB), [F', traD36, proAB, iac<sup>o</sup>ZAM15]</i>	Promega, Madison, United States
<i>Escherichia coli</i> Rosetta	<i>[F', traD36, ΔompP, proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup>, lacIq, Δ(lacZ)M15]ΔompT, endA1, recA1, gyrA96 (Nal<sup>r</sup>), thi-1, hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>), e14<sup>-</sup> (McrA<sup>-</sup>), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), Δ(rhaBAD)::T7 RNA polymerase</i>	Promega, Madison, United States
<b>Strains used as targets for antimicrobial activity tests</b>		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739		(30)
<i>Listeria innocua</i> CIP 80.11		(62)
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 33420		(63)
<i>Salmonella enterica</i> Serotype Newport ATCC 6962		(64)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		(65)
<b>Plasmids</b>		
pT7-6his-030	<i>pT7, His-tag, Tcv-site, orf030, Amp<sup>R</sup>, LacI, LacO</i>	(30)
pET-32b(+)	pT7, His tag, Trx-tag, S-tag, Amp <sup>R</sup> , LacI, LacO, MCS	Merck Millipore, Burlington, United States
pET-32b-030	pET-32b(+) derivative carrying a 333 pb DNA fragment from pT7-6his-030 with <i>orf030</i> gene	In this study
pET32b-Nter_030	pET-32b(+) derivative carrying a 117 pb DNA fragment from pT7-6his-030 with <i>orf030</i> gene fragment	In this study
pET32b-Cter_030	pET-32b(+) derivative carrying a 216 pb DNA fragment from pT7-6his-030 with <i>orf030</i> gene fragment	In this study

---

338 *pT7*: T7 promoter, *Amp<sup>r</sup>*: ampicillin resistant, *LacI* : lacI coding sequence, *LacO* : lac Operator

339

340 **Construction of derivative ORF030 peptides carrying N-terminal part (Nter- lacticaseicin**  
341 **30), central and C-terminal part (Cter- lacticaseicin 30) and their expression in *E. coli***  
342 **cells**

343 All oligonucleotides used in this work are listed in **Table 4**. The molecular cloning and other  
344 standard techniques used to thereof to perform genetic construction of lacticaseicin 30 and  
345 derivative peptides like Nter- lacticaseicin 30, Cter- lacticaseicin 30 and Nter-H1- lacticaseicin  
346 30 plasmids were described by Sambrook J. et al (54). The *orf030*, *orf030-nter*, *orf030-cter*  
347 and *orf030-nter-h1* were amplified by PCR using pT7-6his-030 plasmid as template and F-  
348 *Bam*HI-030 and R-030-*Hind*III (for *orf030*), F-*Bam*HI-030 and R-Nter\_030-*Hind*III (for  
349 *orf030-nter*), F-*Bam*HI-Cter\_030 and R-030-*Hind*III (for *orf030-cter*) and F-*Bam*HI-030 and  
350 R-Nter-H1\_030-*Hind*III (for *orf030-nter-h1*) primers. Then, each PCR product was cloned  
351 between the *Bam*HI and *Hind*III sites of the pET-32b(+) plasmid.

352 Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, restriction endonucleases and T4 ligase were obtained  
353 from ThermoFischer Scientific (Thermo Scientific, Waltham, MA, United States) and used in  
354 accordance with the manufacturer's instructions. Plasmids and PCR products were purified  
355 using NucleoSpin kits (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and the final plasmid constructions  
356 were verified by PCR and sequencing (Eurofins, Ebersberg, Germany). The resulting sequences  
357 were analyzed using the SnapGenes tool (GSL Biotech LLC, San Diego, USA).



**Table 4.** Sequences of oligonucleotide primers used in this study.

Name	Sequence 5' → 3'	Use
<b>F-BamHI-030</b>	AAAAGGATCCATGACAGACAAACGTGAAACTT	Amplification of <i>orf030</i> up-stream fragment
<b>R-030-HindIII</b>	AAAAAAGCTTCTAATGCCCCAAACAATGG	Amplification of <i>orf030</i> down-stream fragment
<b>R-Nter_030-HindIII</b>	AAAAAAGCTTCTAATCAACCTTTTTGGCGTTGGT	Amplification of <i>orf030_nter</i> down-stream fragment
<b>F-BamHI-Cter_030</b>	AAAAGGATCCATGGAAGGTGATGACGAAAAGGC	Amplification of <i>orf030_cter</i> up-stream fragment
<b>R-Nter-H1_030-HindIII</b>	AAAAAAGCTTTTACGTTGGATTAGCGTATGCC	Amplification of <i>orf030_nter-h1</i> down-stream fragment
<b>F-030_mutE6G</b>	ACAGACAAACGTGGAACCTTAAT	to make mutations in the pT7-6his-030 plasmid in order to replace the Glu 6 to Gly in ORF030
<b>R-030_mutE6G</b>	ATTAAGTTCACGTTTGTCTGT	
<b>F-030_mutT7P</b>	AAACGTGAACCTTTAATGTCTG	to make mutations in the pT7-6his-030 plasmid in order to replace the Thr 7 to Pro in ORF030
<b>R-030_mutT7P</b>	CGACATTAAAGGTTACGTTT	
<b>F-030_mutE32G</b>	GCGCTTATCGGAACCAACG	to make mutations in the pT7-6his-030 plasmid in order to replace the Glu 32 to Gly in ORF030
<b>R-030_mutE32G</b>	CGTTGGTTCCGATAAGCGC	
<b>F-030_mutT33P</b>	GCTTATCGAACCAACG	to make mutations in the pT7-6his-030 plasmid in order to replace the Thr 33 to Pro in ORF030
<b>R-030_mutT33P</b>	GCGTTGGTTCCGATAAGC	
<b>F-030_mutT52P</b>	CGGCTGTCCCTCAGTT	to make mutations in the pT7-6his-030 plasmid in order to replace the Thr 52 to Pro in ORF030
<b>R-030_mutT52P</b>	AACTGAGGGACAGCCG	
<b>F-030_mutD57G</b>	GTTGTCCCACGGCATTTC	to make mutations in the pT7-6his-030 plasmid in order to replace the Asp 57 to Gly in ORF030
<b>R-030_mutD57G</b>	GGAAATGCCGTGGGACAAC	
<b>F-030_mutA77P</b>	CTGGTGCCCGTCTTCA	to make mutations in the pT7-6his-030 plasmid in order to replace the Ala 77 to Pro in ORF030
<b>R-030_mutA77P</b>	TGAAGACGGGCACCAG	
<b>F-030_mutY78S</b>	CCGTCTTCAATTCATCAAAAA	to make mutations in the pT7-6his-030 plasmid in order to replace the Tyr 78 to Ser in ORF030
<b>R-030_mutY78S</b>	TTTTTGATGGAATTGAAGACGG	
<b>F-030_mutY93S</b>	GCACGTTCTCGCGCGCAA	to make mutations in the pT7-6his-030 plasmid in order to replace the Tyr 93 to Ser in ORF030
<b>R-030_mutY93S</b>	TTGCGCGCGAGAACGTGC	
<b>F-030_mutA97P</b>	GCGCAACCTTGCC	to make mutations in the pT7-6his-030 plasmid in order to replace the Ala 97 to Pro in ORF030
<b>R-030_mutA97P</b>	GCCAAGGGTTGCGC	
<b>T7</b>	TAATACGACTCACTATAGGGGA	Cloning verification in pET-32(+) plasmid
<b>T7 term</b>	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	

361 **Construction of derivative lacticaseicin carrying N-terminal part (Nter- lacticaseicin 30),**  
362 **central and C-terminal part (Cter- lacticaseicin 30) and their expression in *E. coli* cells**

363 All oligonucleotides used in this work are listed in **Table 4**. The molecular cloning and other  
364 standard techniques used to thereof to perform genetic construction of lacticaseicin 30 and  
365 derivative peptides like Nter- lacticaseicin 30, Cter- lacticaseicin 30 and Nter-H1- lacticaseicin  
366 30 plasmids were described by Sambrook J. et al (54). The *orf030*, *orf030-nter*, *orf030-cter*  
367 and *orf030-nter-h1* were amplified by PCR using pT7-6his-030 plasmid as template and F-  
368 *Bam*HI-030 and R-030-*Hind*III (for *orf030*), F-*Bam*HI-030 and R-Nter\_030-*Hind*III (for  
369 *orf030-nter*), F-*Bam*HI-Cter\_030 and R-030-*Hind*III (for *orf030-cter*) and F-*Bam*HI-030 and  
370 R-Nter-H1\_030-*Hind*III (for *orf030-nter-h1*) primers. Then, each PCR product was cloned  
371 between the *Bam*HI and *Hind*III sites of the pET-32b(+) plasmid.

372 Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, restriction endonucleases and T4 ligase were obtained  
373 from ThermoFischer Scientific (Thermo Scientific, Waltham, MA, United States) and used in  
374 accordance with the manufacturer's instructions. Plasmids and PCR products were purified  
375 using NucleoSpin kits (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and the final plasmid constructions  
376 were verified by PCR and sequencing (Eurofins, Ebersberg, Germany). The resulting sequences  
377 were analyzed using the SnapGenes tool (GSL Biotech LLC, San Diego, USA).

378

379 **Construction of lacticaseicin 30 peptide derivatives plasmids for expression in *E. coli* cells**

380 Each lacticaseicin derivative plasmid was generated by site-directed mutagenesis using the  
381 pT7-6his-030 plasmid as template and the appropriate primers (**Table 4**), using the QuikChange  
382 II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), following the  
383 recommended instructions.

384

385

## 386 **Expression and purification of lacticaseicin 30 and its variant-peptides**

387 Each plasmid constructed in this work has been expressed in *E. coli* Rosetta strain and grown  
388 at 37°C in LB broth, supplemented with ampicillin, until to reach the mid-log phase. Expression  
389 was then induced by adding 0.5 mM isopropyl  $\beta$ -d-1-thiogalactopyranoside (IPTG, Sigma-  
390 Aldrich, St Louis, MO, USA), and the cells were incubated for three additional hours at 37 °C  
391 with shaking at 160 rpm. Afterwhich, cells were harvested by centrifugation and re-suspended  
392 in the Tris–HCl buffer (20 mM Tris–HCl pH 8, 300 mM NaCl).

393 Then, cells were lysed by sonication (OmniRuptor 4000 Ultrasonic Homogenizer, Omni  
394 International, Kennessaw, GA, USA) on ice-cold water and centrifugated at 11,000 g for 1 hour.  
395 The supernatant was loaded onto a column containing Nickel resin grafted on a nitrilo-tri-acetic  
396 matrix (Protino Ni-NTA Agarose, Machery-Nagel, Düren, Germany) previously equilibrated  
397 with Tris–HCl buffer. Resin was washed with 2 x 10 bed volumes of Nickel resin of the same  
398 buffer supplemented with 30 mM imidazole and the bacteriocins were eluted using 5 bed  
399 volumes of Nickel resin of the previous buffer supplemented with 200 mM imidazole. A  
400 desalting step was performed using PD miditrap columns (GE Healthcare Life Science, Pollard,  
401 United Kingdom) to remove the imidazole. The histidine-tag was removed with Tev-protease  
402 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), while TRX-tag was removed with Enterokinase (New  
403 England Biolabs, Ipswich, USA). To separate the tag and the peptide without tag, an additional  
404 Ni-NTA chromatography was performed. The purity is verified by Tricine-SDS-PAGE (55).  
405 When necessary, bacteriocins suspensions without salt were lyophilized using the Freeze dryer  
406 Lyolab 3000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, United States) following the recommended  
407 instructions.

408 Final concentration of each peptide after being purified was determined with the Bicinchoninic  
409 Acid Assay protein kit (BCA, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), as recommended by the  
410 supplier.

411 **Mass spectrometry**

412 The bacteriocin was detected by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass  
413 spectrometry (MALDI-TOF/MS). Before to start the analysis, bacteriocin suspension was  
414 concentrated using Pierce™ C18 tips (Thermo Scientific, Waltham, MA, United States). The  
415 analysis was carried out using the Autoflex Speed MALDI TOF/TOF equipment (Bruker  
416 Daltonics, Bremen, Germany) and spectra were obtained using flexAnalysis softwear (Bruker  
417 Daltonics, Bremen, Germany).

418

419 **Circular dichroism spectroscopy**

420 Circular dichroism measurements were performed in a 1 mm quartz cuvette using the JASCO  
421 810 spectrophotometer performed (Jasco, Tokyo, Japan) without or with 10 mM of sodium  
422 dodecyl sulfate (SDS) micelle. The acquisition of the spectra was performed at 25°C, in the  
423 wavelength range from 190 to 260 nm for all samples and under nitrogen atmosphere. Before  
424 the measurement, the lyophilized bacteriocin was dissolved in phosphate buffer at pH 7 or pH  
425 5 (56) to obtain a final concentration equivalent to 12 µg/ml. All spectra were recorded with  
426 appropriate blank subtractions and averaging of three independent measurements. The amounts  
427 of structural motifs were calculated using the BeStSel server (57).

428 To complement the results obtained by the circular dichroism method, a prediction of the  
429 secondary and three-dimensional structure of the Lacticaseicin 30 was performed using the I-  
430 Tasser tool (58, 59).

431

432 **Antimicrobial activity**

433 The antimicrobial activity of the lacticaseicin 30 and its derivatives were tested by critical-  
434 dilution micromethod using different target strains (60). Samples were acidified to a pH 5 and  
435 sterilized by filtration. Serial double dilutions of the filtrate samples were made in 200 µl  
436 volumes of BHI in a sterile 96-well Falcon microtiter plate (Corning, Tewksbury, MA, USA).

437 Each well was inoculated with 2 µl of overnight culture of the target strain. Then, microplates  
438 were incubated at 37°C for 24 h without agitation. Bacterial growth was estimated by measuring  
439 absorbance at 620 nm using a microtiter plate scanner (Biotech Instruments Inc, Winooski, VT,  
440 USA). The antibacterial activity was determined in Arbitrary Units per millilitre (AU/ml)  
441 according to the following formula:  $2^n \times (1000 \mu\text{l} / \text{deposited volume})$ , with n corresponding to  
442 the highest number of dilution at which growth inhibition of the sensitive strain is observed  
443 (61). Therefore, the minimal inhibitory concentration was directly determined from the  
444 bacteriocin activity and was defined as the lowest concentration of bacteriocin resulting in no  
445 visible turbidity after 24 h of incubation.

446

447 **Acknowledgments:** The authors are grateful to Dr. Yanath Belguesmia, Dr. Marc Maresca and  
448 Dr. Stephen W. Elson for the critical reading of the manuscript and the English improvement  
449 of this manuscript. The MALDI-TOF/MS experiments were performed on the REALCAT  
450 platform funded by the French government grant managed by the French National Research  
451 Agency (ANR) as part of the "Investments for the Future" program (ANR-11-EQPX-0037).  
452 We also acknowledge the Hauts-de-France region, the ERDF, the Ecole Centrale de Lille, and  
453 the Foundation Centrale Initiatives for financial support with the acquisition of the REALCAT  
454 platform equipment.

455 **Funding:** This research was funded by La Région des Hauts-de-France, through ALIBIOTECH  
456 CPER/FEDER 2016/2021.

457 **Conflicts of Interest:** "The authors declare no conflict of interest."

458

#### 459 **References:**

- 460 1. Michael, C. A., Dominey-Howes, D., and Labbate, M. (2014) The antimicrobial resistance crisis:  
461 causes, consequences, and management. *Front Public Health*. **2**, 145
- 462 2. Viswanathan, V. (2014) Off-label abuse of antibiotics by bacteria. *Gut Microbes*. **5**, 3–4
- 463 3. Jim O'Neill (2016) *Nature Reviews Drug Discovery*. **15**, 526–526

- 464 4. Chan, B. K., Abedon, S. T., and Loc-Carrillo, C. (2013) Phage cocktails and the future of phage  
465 therapy. *Future Microbiol.* **8**, 769–783
- 466 5. Zalewska-Piątek, B., and Piątek, R. (2021) Bacteriophages as potential tools for use in  
467 antimicrobial therapy and vaccine development. *Pharmaceuticals.* **14**, 331
- 468 6. Kadouri, D. E., To, K., Shanks, R. M. Q., and Doi, Y. (2013) Predatory bacteria: A potential ally  
469 against multidrug-resistant Gram-Negative pathogens. *PLOS ONE.* **8**, e63397
- 470 7. Schneitz, C. (2005) Competitive exclusion in poultry—30 years of research. *Food Control.* **16**,  
471 657–667
- 472 8. Cotter, P. D., Ross, R. P., and Hill, C. (2013) Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nat*  
473 *Rev Microbiol.* **11**, 95–105
- 474 9. Ołdak, A., and Zielińska, D. (2017) Bacteriocins from lactic acid bacteria as an alternative to  
475 antibiotics. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* **71**, 328–338
- 476 10. Soltani, S., Hammami, R., Cotter, P. D., Rebuffat, S., Said, L. B., Gaudreau, H., Bédard, F., Biron,  
477 E., Drider, D., and Fliss, I. (2021) Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: toxicity  
478 aspects and regulations. *FEMS Microbiol Rev.* 10.1093/femsre/fuaa039
- 479 11. Allen, H. K. (2017) Alternatives to antibiotics: why and how. *NAM Perspectives.*  
480 10.31478/201707g
- 481 12. Drider, D., and Rebuffat, S. (2011) *Prokaryotic antimicrobial peptides: From genes to*  
482 *applications*, Springer Science & Business Media
- 483 13. Flaherty, R. A., Freed, S. D., and Lee, S. W. (2014) The wide world of ribosomally encoded  
484 bacterial peptides. *PLoS Pathog.* **10**, e1004221
- 485 14. Salazar, F., Ortiz, A., and Sansinenea, E. (2017) Characterisation of two novel bacteriocin-like  
486 substances produced by *Bacillus amyloliquefaciens* ELI149 with broad-spectrum antimicrobial  
487 activity. *J Glob Antimicrob Resist.* **11**, 177–182
- 488 15. Dobson, A., Cotter, P. D., Ross, R. P., and Hill, C. (2012) Bacteriocin production: a probiotic trait?  
489 *Appl Environ Microbiol.* **78**, 1–6
- 490 16. Chikindas, M. L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V. A., and Dicks, L. M. T. (2018) Functions  
491 and emerging applications of bacteriocins. *Curr Opin Biotechnol.* **49**, 23–28
- 492 17. Yang, S.-C., Lin, C.-H., Sung, C. T., and Fang, J.-Y. (2014) Antibacterial activities of bacteriocins:  
493 application in foods and pharmaceuticals. *Front. Microbiol.* **5**, 241
- 494 18. Belguesmia, Y., Madi, A., Sperandio, D., Merieau, A., Feuilloley, M., Prévost, H., Drider, D., and  
495 Connil, N. (2011) Growing insights into the safety of bacteriocins: the case of enterocin S37. *Res*  
496 *Microbiol.* **162**, 159–163
- 497 19. Eveno, M., Savard, P., Belguesmia, Y., Bazinet, L., Gancel, F., Drider, D., and Fliss, I. (2021)  
498 Compatibility, cytotoxicity, and gastrointestinal tenacity of bacteriocin-producing bacteria  
499 selected for a consortium probiotic formulation to be used in livestock feed. *Probiotics Antimicrob*  
500 *Proteins.* **13**, 208–217
- 501 20. Simons, A., Alhanout, K., and Duval, R. E. (2020) Bacteriocins, antimicrobial peptides from  
502 bacterial origin: overview of their biology and heir impact against multidrug-resistant bacteria.  
503 *Microorganisms.* **8**, 639
- 504 21. Perez, R. H., Zendo, T., and Sonomoto, K. (2014) Novel bacteriocins from lactic acid bacteria  
505 (LAB): various structures and applications. *Microb Cell Fact.* **13 Suppl 1**, S3
- 506 22. Cotter, P. D., Hill, C., and Ross, R. P. (2005) Bacteriocins: developing innate immunity for food.  
507 *Nat Rev Microbiol.* **3**, 777–788
- 508 23. Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., and Kuipers, O. P. (2016) Bacteriocins of lactic  
509 acid bacteria: extending the family. *Appl Microbiol Biotechnol.* **100**, 2939–2951
- 510 24. Drider, D., Bendali, F., Naghmouchi, K., and Chikindas, M. L. (2016) Bacteriocins: not only  
511 antibacterial agents. *Probiotics & Antimicro. Prot.* **8**, 177–182
- 512 25. Helander, I. M., von Wright, A., and Mattila-Sandholm, T.-M. (1997) Potential of lactic acid  
513 bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends Food Sci. Technol.* **8**,  
514 146–150
- 515 26. Martin-Visscher, L. A., Yoganathan, S., Sit, C. S., Lohans, C. T., and Vederas, J. C. (2011) The  
516 activity of bacteriocins from *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307 against Gram-negative  
517 bacteria in combination with EDTA treatment. *FEMS Microbiol Lett.* **317**, 152–159

- 518 27. Stern, N. J., Svetoch, E. A., Eruslanov, B. V., Perelygin, V. V., Mitsevich, E. V., Mitsevich, I. P.,  
519 Pokhilenko, V. D., Levchuk, V. P., Svetoch, O. E., and Seal, B. S. (2006) Isolation of a  
520 *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to  
521 *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system. *Antimicrob Agents Chemother.* **50**,  
522 3111–3116
- 523 28. Messaoudi, S., Kergourlay, G., Dalgalarrrondo, M., Choiset, Y., Ferchichi, M., Prévost, H., Pilet,  
524 M.-F., Chobert, J.-M., Manai, M., and Dousset, X. (2012) Purification and characterization of a  
525 new bacteriocin active against *Campylobacter* produced by *Lactobacillus salivarius* SMXD51.  
526 *Food Microbiol.* **32**, 129–134
- 527 29. Todorov, S. D., and Dicks, L. M. T. (2005) *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses  
528 produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. *Enzyme Microb. Technol.* **36**, 318–  
529 326
- 530 30. Belguesmia, Y., Bendjeddou, K., Kempf, I., Boukherroub, R., and Drider, D. (2020) Heterologous  
531 biosynthesis of five new class II bacteriocins from *Lactobacillus paracasei* CNCM I-5369 with  
532 antagonistic activity against pathogenic *Escherichia coli* strains. *Front. Microbiol.*  
533 10.3389/fmicb.2020.01198
- 534 31. Naghmouchi, K., Drider, D., and Fliss, I. (2007) Action of divergicin M35, a class IIa bacteriocin,  
535 on liposomes and *Listeria*. *J. Appl. Microbiol.* **102**, 1508–1517
- 536 32. Madi-Moussa, D., Coucheney, F., and Drider, D. (2021) Expression of five class II bacteriocins  
537 with activity against *Escherichia coli* in *Lacticaseibacillus paracasei* CNCM I-5369, and in a  
538 heterologous host. *Biotechnol. Rep.* 10.1016/j.btre.2021.e00632
- 539 33. Tulumello, D. V., and Deber, C. M. (2009) SDS micelles as a membrane-mimetic environment  
540 for transmembrane segments. *Biochemistry.* **48**, 12096–12103
- 541 34. Nilsson, I., Sääf, A., Whitley, P., Gafvelin, G., Waller, C., and von Heijne, G. (1998) Proline-  
542 induced disruption of a transmembrane  $\alpha$ -helix in its natural environment 11 Edited by F. Cohen.  
543 *Journal of Molecular Biology.* **284**, 1165–1175
- 544 35. Li, Y., Xiang, Q., Zhang, Q., Huang, Y., and Su, Z. (2012) Overview on the recent study of  
545 antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides.* **37**,  
546 207–215
- 547 36. Pommer, A. J., Wallis, R., Moore, G. R., James, R., and Kleanthous, C. (1998) Enzymological  
548 characterization of the nuclease domain from the bacterial toxin colicin E9 from *Escherichia coli*.  
549 *Biochem J.* **334**, 387–392
- 550 37. Oscáriz, J. C., and Pisabarro, A. G. (2001) Classification and mode of action of membrane-active  
551 bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Int Microbiol.* **4**, 13–19
- 552 38. da Silva Sabo, S., Vitolo, M., González, J. M. D., and Oliveira, R. P. de S. (2014) Overview of  
553 *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Res*  
554 *Int.* **64**, 527–536
- 555 39. Meade, E., Slattery, M. A., and Garvey, M. (2020) Bacteriocins, potent antimicrobial peptides and  
556 the fight against multi drug resistant species: resistance is futile? *Antibiotics (Basel).* **9**, 32
- 557 40. Li, J., Koh, J.-J., Liu, S., Lakshminarayanan, R., Verma, C. S., and Beuerman, R. W. (2017)  
558 Membrane active antimicrobial peptides: translating mechanistic insights to design. *Front.*  
559 *Neurosci.* **11**, 73
- 560 41. Pérez-Ramos, A., Madi-Moussa, D., Coucheney, F., and Drider, D. (2021) Current knowledge of  
561 the mode of action and immunity mechanisms of LAB-bacteriocins. *Microorganisms.* **9**, 2107
- 562 42. Harris, F., Dennison, S. R., and Phoenix, D. A. (2009) Anionic antimicrobial peptides from  
563 eukaryotic organisms. *Curr Protein Pept Sci.* **10**, 585–606
- 564 43. Epand, R. M., and Vogel, H. J. (1999) Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms  
565 of action. *Biochim Biophys Acta.* **1462**, 11–28
- 566 44. Clark, S., Jowitt, T. A., Harris, L. K., Knight, C. G., and Dobson, C. B. (2021) The lexicon of  
567 antimicrobial peptides: a complete set of arginine and tryptophan sequences. *Commun Biol.* **4**, 1–  
568 14
- 569 45. van Kraaij, C., Breukink, E., Noordermeer, M. A., Demel, R. A., Siezen, R. J., Kuipers, O. P., and  
570 de Kruijff, B. (1998) Pore formation by nisin involves translocation of its C-terminal part across  
571 the membrane. *Biochemistry.* **37**, 16033–16040

- 572 46. Johnsen, L., Fimland, G., and Nissen-Meyer, J. (2005) The C-terminal domain of pediocin-like  
573 antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C-terminal  
574 part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum. *J Biol Chem.*  
575 **280**, 9243–9250
- 576 47. Rihakova, J., Petit, V. W., Demnerova, K., Prévost, H., Rebuffat, S., and Drider, D. (2009) Insights  
577 into structure-activity relationships in the C-terminal region of divercin V41, a class IIa bacteriocin  
578 with high-level antilisterial activity. *Appl Environ Microbiol.* **75**, 1811–1819
- 579 48. Torres, M. D. T., Sothiselvam, S., Lu, T. K., and de la Fuente-Nunez, C. (2019) Peptide Design  
580 Principles for Antimicrobial Applications. *J Mol Biol.* **431**, 3547–3567
- 581 49. Mattiuzzo, M., Bandiera, A., Gennaro, R., Benincasa, M., Pacor, S., Antcheva, N., and Scocchi,  
582 M. (2007) Role of the *Escherichia coli* SbmA in the antimicrobial activity of proline-rich peptides.  
583 *Mol Microbiol.* **66**, 151–163
- 584 50. Seefeldt, A. C., Nguyen, F., Antunes, S., Pérébasquine, N., Graf, M., Arenz, S., Inampudi, K. K.,  
585 Douat, C., Guichard, G., Wilson, D. N., and Innis, C. A. (2015) The proline-rich antimicrobial  
586 peptide Onc112 inhibits translation by blocking and destabilizing the initiation complex. *Nat.*  
587 *Struct. Mol. Biol.* **22**, 470–475
- 588 51. Lee, J. H., Cho, K. S., Lee, J., Yoo, J., Lee, J., and Chung, J. (2001) Diptericin-like protein: an  
589 immune response gene regulated by the anti-bacterial gene induction pathway in *Drosophila*.  
590 *Gene.* **271**, 233–238
- 591 52. Kwon, Y. M., Kim, H. J., Kim, Y. I., Kang, Y. J., Lee, I. H., Jin, B. R., Han, Y. S., Cheon, H. M.,  
592 Ha, N. G., and Seo, S. J. (2008) Comparative analysis of two attacin genes from *Hyphantria cunea*.  
593 *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* **151**, 213–220
- 594 53. Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., and D’Ari, R. (2007) *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani  
595 broth. *J Bacteriol.* **189**, 8746–8749
- 596 54. Sambrook, J. and Russell, D.W (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd Edition, Cold  
597 Spring Harbor Laboratory Press
- 598 55. Schägger, H. (2006) Tricine–SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* **1**, 16–22
- 599 56. Green, A. A. (2002) The preparation of acetate and phosphate buffer solutions of known PH and  
600 Ionic strength. *ACS Publications.* 10.1021/ja01333a018
- 601 57. Micsonai, A., Wien, F., Bulyáki, É., Kun, J., Moussong, É., Lee, Y.-H., Goto, Y., Réfrégiers, M.,  
602 and Kardos, J. (2018) BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction  
603 and fold recognition from the circular dichroism spectra. *Nucleic Acids Res.* **46**, W315–W322
- 604 58. Roy, A., Kucukural, A., and Zhang, Y. (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein  
605 structure and function prediction. *Nat Protoc.* **5**, 725–738
- 606 59. Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., and Zhang, Y. (2015) The I-TASSER Suite: protein  
607 structure and function prediction. *Nat Methods.* **12**, 7–8
- 608 60. Daba, H., Pandian, S., Gosselin, J. F., Simard, R. E., Huang, J., and Lacroix, C. (1991) Detection  
609 and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl. Environ. Microbiol.*  
610 **57**, 3450–3455
- 611 61. Batdorj, B., Dalgalarondo, M., Choiset, Y., Pedroche, J., Métro, F., Prévost, H., Chobert, J.-M.,  
612 and Haertlé, T. (2006) Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic  
613 acid bacteria isolated from Mongolian airag. *J Appl Microbiol.* **101**, 837–848
- 614 62. Todorov, S. D., Rachman, C., Fourrier, A., Dicks, L. M. T., van Reenen, C. A., Prévost, H., and  
615 Dousset, X. (2011) Characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* R1333  
616 isolated from smoked salmon. *Anaerobe.* **17**, 23–31
- 617 63. van Vuuren, S. F., Nkwanyana, M. N., and de Wet, H. (2015) Antimicrobial evaluation of plants  
618 used for the treatment of diarrhoea in a rural community in northern Maputaland, KwaZulu-Natal,  
619 South Africa. *BMC Complement Altern Med.* **15**, 53
- 620 64. Rupasinghe, H. P. V., Boulter-Bitzer, J., Ahn, T., and Odumeru, J. A. (2006) Vanillin inhibits  
621 pathogenic and spoilage microorganisms *in vitro* and aerobic microbial growth in fresh-cut apples.  
622 *Int. Food Res. J.* **39**, 575–580
- 623 65. Fass, R. J., and Barnishan, J. (1979) Minimal inhibitory concentrations of 34 antimicrobial agents  
624 for control strains *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.  
625 *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **16**, 622–624  
626



**Chapitre 3 : Application de la combinaison de la  
lacticaséicine 30-colistine contre des souches cliniques  
d'entérobactéries affichant une résistance à la colistine**

Application of the lacticaseicin 30-colistin combination  
against enterobacterial clinical strains exhibiting colistin  
resistance phenotypes

## Résumé

Dans ce chapitre, nous avons voulu caractériser l'effet de la lacticaséicine 30 produite en système hétérologue seule, ou l'effet de celle-ci quand elle est combinée à la colistine sur des souches cliniques à Gram-négatif résistantes à la colistine.

Différentes entérobactéries pathogènes isolées de patients hospitalisés au Centre hospitalier universitaire de Lille ont été utilisées. Parmi les souches, il y a *Enterobacter cloacae* H51, *Salmonella* Enteritidis H10, *S. Typhimurium* H97, *E. coli* 45, *E. coli* 51, *E. coli* 66, *Klebsiella oxytoca* H40, *K. variicola* H71, *K. variicola* H77, *K. pneumoniae* H79 et *K. pneumoniae* H79. A noter que les profils génétiques de ces souches ont été déterminés par la technique de RAPD (random amplified polymorphism DNA), pour écarter les souches redondantes. Un antibiogramme a été réalisé pour examiner la sensibilité de ces souches contre un large panel d'antibiotiques. L'antibiogramme a été réalisé par le système VITEK<sup>®</sup> 2 (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, France), et se basant sur les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) et celles de European Committee for Antibiotic Susceptibility Testing (l'EUCAST). Les 11 souches d'entérobactéries testées ont révélé des profils de multirésistante et présentent toutes une résistance à la colistine. Par ailleurs, le gène *mcr* conférant la résistance à la colistine de chaque souche cible, a été identifié par la technique de PCR. Toutes les souches présentent le gène *mcr-1*, excepté les souches *E. cloacae* H51, *E. coli* 52 et *K. variicola* H77. Les souches *E. cloacae* H51 et *K. variicola* H77 possèdent, quant à elles, le gène *mcr-9*, tandis que le support génétique de résistance à la colistine de la souche *E. coli* 52 reste à élucider.

Après avoir produit et purifié la lacticaséicine 30 recombinante, la synergie de cette dernière avec la colistine a été évaluée contre les souches précédemment citées, en utilisant la méthode de « l'échiquier ». Un effet synergique résultant de la combinaison de la lacticaséicine 30 et de la colistine a été observé pour les souches *E. coli* 45, *E. coli* 51, *E. coli* 52, *E. coli* 66, *K. variicola* H77 et *S. typhimurium* H97.





L'expression du gène *mcr* des souches pour lesquelles un effet synergique de la lacticaséicine 30-colistine a été observé, a fait l'objet d'une analyse par la technique de qPCR, après traitement de la souche cible avec chacun de ces antibactériens (colistine, lacticaséicine 30 et leur combinaison) à des concentrations subinhibitrices (CMI/2). Nous avons constaté que la présence de la colistine seule à des concentrations subinhibitrices induisait une surexpression du gène *mcr*, alors que le traitement par la combinaison lacticaséicine 30-colistine diminuait drastiquement leur niveau d'expression.

**Publication 4 : Lacticaseicin 30-colistine, nouvelle  
formulation d'antibiotique contre les bactéries à Gram-  
négatif productrices de  $\beta$ -lactamase et résistantes à la  
colistine**

Lacticaseicin 30 and colistin as a novel antibiotic formulation  
against Gram-negative  $\beta$ -lactamase producing strains and  
colistin resistant strains

## Article

# Lacticaseicin 30 and Colistin as a Promising Antibiotic Formulation against Gram-Negative $\beta$ -Lactamase-Producing Strains and Colistin-Resistant Strains

Désiré Madi-Moussa <sup>1</sup>, Yanath Belguesmia <sup>1</sup>, Audrey Charlet <sup>2</sup>, Djamel Drider <sup>1</sup>  
and Françoise Coucheney <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> UMR Transfrontalière BioEcoAgro 1158, Univ. Lille, INRAE, Univ. Liège, UPJV, YNCREA, Univ. Artois, Univ. Littoral Côte d'Opale, ICV—Institut Charles Viollette, F-59000 Lille, France; desire.madimoussa.etu@univ-lille.fr (D.M.-M.); yanath.belguesmia@univ-lille.fr (Y.B.); djamel.drider@univ-lille.fr (D.D.)
- <sup>2</sup> Centre Hospitalier de Lille, Centre de Biologie Pathologie, Laboratoire de Bactériologie, F-59000 Lille, France; audrey.charlet@chru-lille.fr
- \* Correspondence: Françoise.Coucheney@univ-lille.fr

**Abstract:** Antimicrobial resistance is a global health concern across the world and it is foreseen to swell if no actions are taken now. To help curbing this well announced crisis different strategies are announced, and these include the use of antimicrobial peptides (AMP), which are remarkable molecules known for their killing activities towards pathogenic bacteria. Bacteriocins are ribosomally synthesized AMP produced by almost all prokaryotic lineages. Bacteriocins, unlike antibiotics, offer a set of advantages in terms of cytotoxicity towards eukaryotic cells, their mode of action, cross-resistance and impact of microbiota content. Most known bacteriocins are produced by Gram-positive bacteria, and specifically by lactic acid bacteria (LAB). LAB-bacteriocins were steadily reported and characterized for their activity against genetically related Gram-positive bacteria, and seldom against Gram-negative bacteria. The aim of this study is to show that lacticaseicin 30, which is one of the bacteriocins produced by *Lacticaseibacillus paracasei* CNCM I-5369, is active against Gram-negative clinical strains (*Salmonella enterica* Enteritidis H10, *S. enterica* Typhimurium H97, *Enterobacter cloacae* H51, *Escherichia coli* H45, *E. coli* H51, *E. coli* H66, *Klebsiella oxytoca* H40, *K. pneumoniae* H71, *K. variicola* H77, *K. pneumoniae* H79, *K. pneumoniae* H79), whereas antibiotics failed. In addition, lacticaseicin 30 and colistin enabled synergistic interactions towards the aforementioned target Gram-negative clinical strains. Further, the combinations of lacticaseicin 30 and colistin prompted a drastic downregulation of *mcr-1* and *mcr-9* genes, which are associated with the colistin resistance phenotypes of these clinical strains. This report shows that lacticaseicin 30 is active against Gram-negative clinical strains carrying a rainbow of *mcr* genes, and the combination of these antimicrobials constitutes a promising therapeutic option that needs to be further exploited.

**Keywords:** lacticaseicin 30; colistin; Gram-negative clinical strains; beta-lactamase; synergistic activities; RT-qPCR



**Citation:** Madi-Moussa, D.; Belguesmia, Y.; Charlet, A.; Drider, D.; Coucheney, F. Lacticaseicin 30 and Colistin as a Promising Antibiotic Formulation against Gram-Negative  $\beta$ -Lactamase-Producing Strains and Colistin-Resistant Strains. *Antibiotics* **2022**, *11*, 20. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010020>

Academic Editors: Daniele Castagnolo, Jürgen Brem, Mark G. Moloney and Sónia Silva

Received: 25 November 2021

Accepted: 21 December 2021

Published: 24 December 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Antimicrobial resistance (AMR), which has existed long before the antimicrobial era, is recognized as a serious public health threat around the world. Currently, more than 700,000 people die every year because of this phenomenon, and this number is thought to swell to 10 million by 2050, if radical actions are not taken now [1,2]. Antibiotics started to fail because of their overuse and misuse in human and animal medicine, as well as for their inappropriate recommendation. Nonetheless, unsuspected contributors such as commensal organisms, which are interconnected with microbial communities, are thought to play a role in the spread of this resistance [3]. AMR is developing rapidly to outstrip the rate at which new antimicrobials are introduced in the markets. The global effort to develop

new antibiotics or modify the existing ones in order to fight AMR is considered overall to be a huge task. In spite of this worrying situation, large pharmaceutical companies have dropped out the market of antibiotics, in favor of advantageous lines of drug development such as those utilized in the cancer treatments [4,5], arguing that the cost–benefit ratio is much more favorable for other drugs.

The ways to tackle AMR and help curbing this crisis include several measures, among which the use of AMPs, which are produced by all living cells [6]. Most of AMP are of cationic nature, able to bind and interact with the negatively charged bacterial cell membranes, causing thereof a leakage of intracellular constituents, ATP depletion and cell death [7].

Bacteriocins are ribosomally synthesized antimicrobial peptides (AMPs) produced by almost all prokaryotic lineages [8–10], with the aim to annihilate competitors. Bacteriocins from Gram-positive bacteria are largely more abundant than their counterparts from Gram-negative bacteria and Archaea [11]. LAB-bacteriocins, which are likely the most studied ones, can be endowed with narrow spectra; therefore, they act only on a limited number of target bacteria, usually consisting of members of the same species, or endowed with broad spectra targeting other species [12]. Currently, there is not a common and universal classification scheme of bacteriocins admitted by all the scientific community. Classifications of bacteriocins are steadily reported, based on advances and progress achieved in this field [13–16]. The mode of action of LAB-bacteriocins against Gram-positives was largely studied [17]. The number of LAB-bacteriocins with activity against Gram-negatives is very low, unlike those with activity against Gram-positive bacteria. A limited number of LAB-bacteriocins active against Gram-negative bacteria was reported during the last decade [18–20], but their mode of action remains to be highlighted. The effectiveness of LAB-bacteriocins towards Gram-negative target bacteria can be explained by the cell-envelope structure, which consists of three layers. The cytoplasmic membrane of Gram-negative bacteria is surrounded by an outer membrane (OM), which is composed of a phospholipids bilayer, and a network of lipids and polysaccharides known as lipopolysaccharides (LPSs) [21]. The OM phospholipids are linked to the inner leaflet of the membrane, and LPS bound to the outer leaflet, which is known to cause endotoxic shock. Of note, LPS act as a barrier to many antibiotics, as well as to hydrophobic compounds [22]. Nevertheless, LPS is considered as the target of colistin, which is a polycationic antibiotic from the polymyxins groups. Colistin is known to bind to LPS and phospholipids in the OM of Gram-negative bacteria. Subsequently, it displaces divalent cations ( $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ ) from the phosphate groups of membrane lipids, which leads to disruption of the OM, causing a leakage of intracellular contents and bacterial death [23]. The rapid increase in the prevalence of Gram-negative pathogens resistant to fluoroquinolones, aminoglycosides and  $\beta$ -lactams (carbapenems, monobactam, cephalosporins and broad-spectrum penicillins) has conducted to rehabilitation of colistin as a last valid therapeutic option [24] to treat infections caused by Gram-negative bacteria considered recalcitrant for the aforementioned drugs.

Recently, we isolated a strain of *Lacticaseibacillus paracasei* CNCM I-5369 capable to produce five distinct class II bacteriocins [20], endowed with activity against Gram-negative bacteria. This particularly interesting feature is to be exploited further as a potential therapeutic option. In 2017, the World Health Organization has categorized problematic pathogens into three categories, and those of priority level include the non-fermentative *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* as well as *Enterobacteriaceae*.

Bacteriocins produced by *L. paracasei* CNCM I-5369 were successfully produced in a heterologous host *Escherichia coli* Rosetta by Madi-Moussa [25]. Bacteriocin coded by *orf30* was particularly important because of its easy production in large quantities, unlike other ones encoded by *orf010*, *orf012*, *orf023* and *orf038* [25]. Noteworthy, bacteriocin 30, hence designed as lacticaicin 30, was assessed in this work alone and in conjunction with colistin against a set of Gram-negative pathogenic bacteria from a clinical source, in order to design a potential therapeutic issue.

## 2. Results

### 2.1. Multifaceted Resistance of Clinical Gram-Negative Bacteria Used in This Work

The antibiogram performed on each strain used as target is given in Supplementary Materials: Table S1. The antibiotics tested here are those recommended by European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) for *Enterobacterales* and the breakpoints used to assess their sensitivity, resistance or intermediate phenotype are from the EUCAST (<https://www.sfm-microbiologie.org/>, accessed on 20 November 2021). All clinical target strains tested in this work exhibited a clear resistance to colistin. Further, many of these target strains underpinned a resistance to most of penicillins tested, associated with resistance to third generation cephalosporins (Table S1). Thus, *E. coli* H45 and *Salmonella* strains showed a resistance to the penicillin but not to carbapenems and cephalosporins, indicating unmodified penicillinase activity. However, remaining *E. coli* H52 and H66 strains showed a typical AmpC beta-lactamase phenotype (Table 1) and presumably belongs to extended spectrum beta-lactamase (ESBL) group [26,27] with resistance to penicillins and at least one of the cephalosporin tested, notably cefoxitin. *E. cloacae* H51, and most of *Klebsiella* strains showed not only resistance to the aforementioned classes of antibiotics, but also to beta-lactamase inhibitors. Thus, the results using MAST disks indicate that these strains exhibited clearly an ESBL phenotype, associated with AmpC for the H77 and H51 strains, which seems to be inducible for this last one (Table 1). Of note, *K. pneumoniae* H71 showed resistance to all the antibiotics tested, including carbapenems, aminoglycosides and quinolones. Moreover, this strain exhibited an ESBL coproduced with an AmpC and a carbapenemase (Table S1 and Table 1).

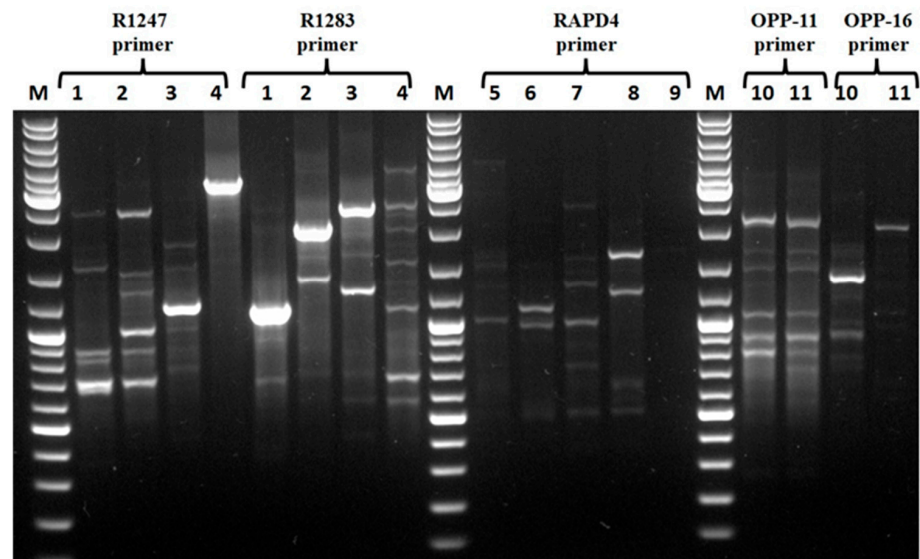
**Table 1.** Beta-lactamase phenotype.

Strains	D72A	D72B	D72C	D72D	D72E	Conclusion
<i>Enterobacter cloacae</i> H51	R	S	R	S	R	EsβL + AmpC Inducible
<i>E. coli</i> H52	R	R	S	S	I	AmpC
<i>E. coli</i> H66	R	R	S	S	S	AmpC
<i>Klebsiella oxytoca</i> H40	R	S	R	S	S	EsβL
<i>K. pneumoniae</i> H71	R	R	R	R	R	EsβL + AmpC + Carbapenemase
<i>K. variicola</i> H77	R	S	I	S	S	EsβL + AmpC
<i>K. pneumoniae</i> H79	R	S	R	S	S	EsβL

Legend. D72A: Cefpodoxime 10 µg discs; D72B: Cefpodoxime 10 µg + EsβL inhibitor discs; D72C: Cefpodoxime 10 µg + AmpC inhibitor discs; D72D: Cefpodoxime 10 µg + EsβL inhibitor + AmpC inhibitor discs; D72E: Cefpodoxime 10 µg + EsβL inhibitor + AmpC inducer discs; R: Resistant; I: Intermediary; S: sensitive.

### 2.2. Amplification and Sequencing of the *mcr* Gene Involved in the Resistance to Colistin

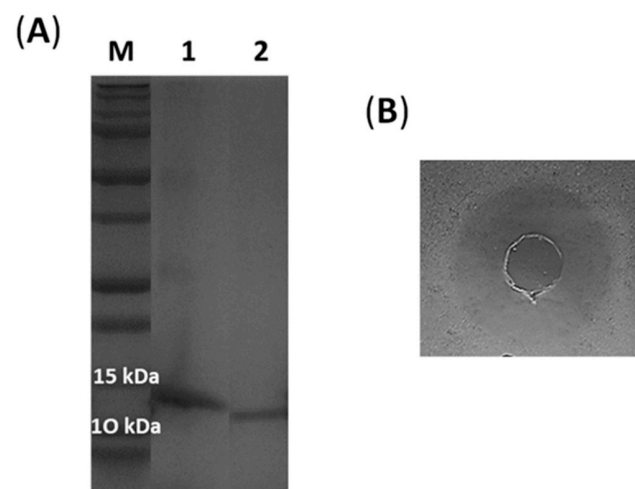
Of note, ten Gram-negative bacteria isolated from diseased patients exhibiting resistance to colistin were analyzed by Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) in order to discard strains with similar genetic patterns. Related to this, *E. coli* strains were obtained when primers R1247 and R1283 were used. Similar results were obtained for *Klebsiella* strains with the RAPD4 primer. When the OPP-11 primer was used with the *S. enterica* Enteritidis H10 and *S. enterica* Typhimurium H97 strains, the RAPD genetic patterns obtained were almost similar, whereas when the OPP16 primer was used the two strains exhibited clearly different patterns (Figure 1). To identify *mcr* gene associated with the colistin resistance phenotype, PCR analyses were conducted using specific primers enabling amplification of each known *mcr* gene as referred in Material Methods section. Of note, the *E. coli* 184 strain was used as a positive control, and this strain is known to carry a colistin resistance gene (*mcr-1*) and *E. coli* ATCC 8739 strain was used as a negative control and this strain is not harboring any *mcr* gene. Analyses of the PCR products on the agarose gel, revealed that all strains possess the *mcr-1* gene, except *E. cloacae* H51, *E. coli* 52 and *K. variicola* H77. Moreover, *E. cloacae* H51 and *K. variicola* H77 strains harbor the *mcr-9* gene, whereas the mechanism involved in the colistin resistance in *E. coli* 52 is not determined, and is not related a priori to the presence of a known *mcr* gene.



**Figure 1.** RAPD analysis of clinical Gram-negative strains, using R1247 and R1283 primers for *E. coli* strains: *E. coli* 184 (1), *E. coli* H45 (2), *E. coli* H51 (3), *E. coli* H66 (4), RAPD4 primer for *Klebsiella* strains: *K. oxytoca* H40 (5), *K. pneumoniae* H71 (6), *K. variicola* H77 (7), *K. pneumoniae* H79 (8), *K. pneumoniae* H79 (9), OPP-11 and OPP-16 for *Salmonella* strains: *S. enterica* Enteritidis H10 (10), *S. enterica* Typhimurium H97 (11).

### 2.3. Expression and Characterization of the Recombinant Lacticaseicin 30

Recombinant histidine-tagged lacticaseicin 30 was expressed in *E. coli* strain Rosetta and purified by the Ni-NTA chromatography. The histidine tag located at the N-terminal part was removed by the TEV protease. The molecular weight of the purified lacticaseicin 30 with and without tag was checked on SDS-PAGE (Figure 2A). The sizes observed on SDS-PAGE, which are 14 kDa for lacticaseicin 30 with tag, and 12 kDa for lacticaseicin 30 without tag, match approximately with those determined with the ExPASy tool (<https://web.expasy.org/protparam>, accessed on 20 November 2021), which indicated a molecular weight of 14,088.07 Da for lacticaseicin 30 with histidine-tag and 12,339.17 Da for lacticaseicin 30 without histidine-tag. The anti-Gram-negative activity of the recombinant lacticaseicin 30 was tested at pH5 using *E. coli* ATCC 8739 as the target strain (Figure 2B), and the MIC value obtained was 40 µg/mL.



**Figure 2.** (A) Purified lacticaseicin 30 with (1) and without (2) histidine-tag (SDS-PAGE, 12% acrylamide), M correspond to size of proteins markers (Dual Xtra Standards, Bio-Rad). (B) Agar diffusion test against *E. coli* ATCC 8739 of lacticaseicin 30 (400 AU/mL) without histidine-tag.



#### 2.4. Lacticaseicin 30 Potentiates the Activity of Colistin and Attenuates the Expression of *mcr* Genes in the Clinical Strains

The combination of lacticaseicin 30 and colistin on colistin-resistant strains was investigated as indicated on Table 2. Based on FICI values obtained, a synergistic interaction was obtained between these two antimicrobials towards *E. coli* 184, *E. coli* H45, *E. cloacae* H51, *E. coli* H52, *E. coli* H66, *K. variicola* H77 and *S. enterica* Typhimurium H97 strains, as lacticaseicin 30 has contributed to significantly decrease the MIC of colistin. Nonetheless, the other strains, as indicated on Table 2, were recalcitrant as no synergistic or antagonistic effect were obtained, arguing that such synergism based on the lacticaseicin 30-colistin combination is target-strain dependent.

**Table 2.** Effects of the lacticaseicin 30-colistin combination against Gram-negative target bacteria displaying resistance to colistin.

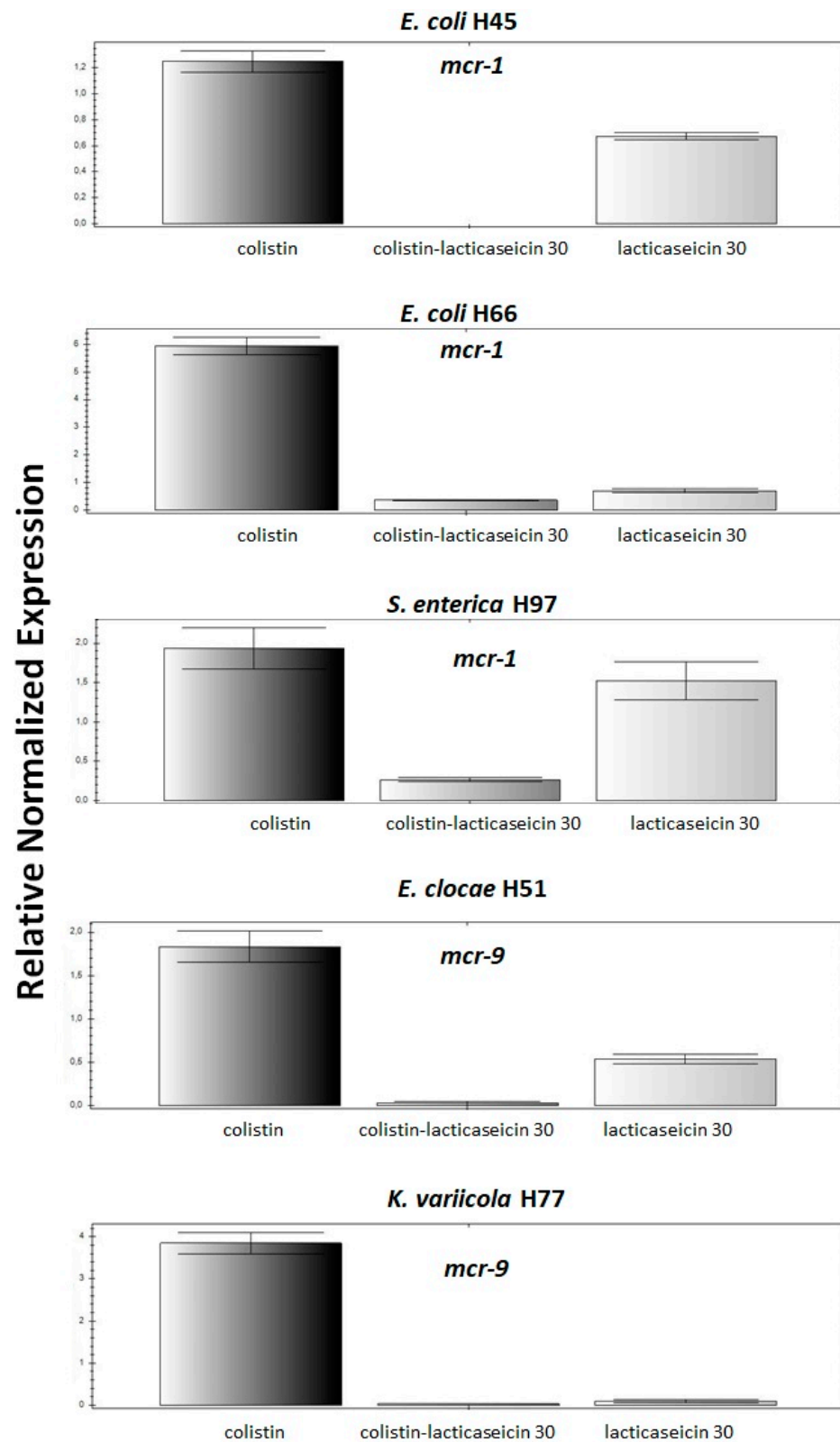
Strains	<i>mcr</i> Gene	Lacticaseicin 30 (µg/mL)	Colistin (µg/mL)	FIC Lacticaseicin 30	FIC Colistin	FIC I	Conclusions
<i>E. coli</i> 184	<i>mcr-1</i>	40	8	0.25	0.125	0.375	Synergism
<i>Enterobacter cloacae</i> H51	<i>mcr-9</i>	40	16	0.25	0.25	0.5	Synergism
<i>E. coli</i> H45	<i>mcr-1</i>	40	8	0.25	0.25	0.5	Synergism
<i>E. coli</i> H52	-	40	16	0.125	0.25	0.375	Synergism
<i>E. coli</i> H66	<i>mcr-1</i>	40	16	0.125	0.25	0.375	Synergism
<i>Klebsiella oxytoca</i> H40	<i>mcr-1</i>	40	64	1	1	2	Indifference
<i>K. pneumoniae</i> H71	<i>mcr-1</i>	40	8	0.5	1	1.5	Indifference
<i>K. variicola</i> H77	<i>mcr-9</i>	40	8	0.25	0.25	0.5	Synergism
<i>K. pneumoniae</i> H79	<i>mcr-1</i>	40	4	0.25	0.5	0.75	Indifference
<i>K. pneumoniae</i> H87	<i>mcr-1</i>	40	32	1	1µ	2	Indifference
<i>Salmonella enterica</i> H10	<i>mcr-1</i>	40	4	1	1	2	Indifference
<i>S. enterica</i> Typhimurium H97	<i>mcr-1</i>	40	8	0.125	0.125	0.25	Synergism

-: unknow.

#### 2.5. The Synergetic Interaction between Lacticaseicin 30-Colistin Downregulated Expression of *mcr* Gene

Expression of *mcr-1* gene in *E. coli* H45, *E. coli* H66 and *S. enterica* Typhimurium H97 strains and *mcr-9* gene in *E. cloacae* 51 and *K. variicola* H77 strains, for which a synergistic interaction was observed were subjected for a qPCR analysis. These strains were incubated with sub-inhibitory concentrations (MIC/2) of colistin, lacticaseicin 30 or their combination as shown on Figure 3 then the fold change in expression of the target gene (*mcr-1* or *mcr-9*) relative to the internal housekeeping gene (16S rRNA) was determined using the  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  method [28]. As expected colistin alone at a sub-inhibitory concentration induced an overexpression of the *mcr* gene in the tested strains. Remarkably, treatment of cells with lacticaseicin 30 alone at a sub-inhibitory concentration has significantly decreased the expression level of the *mcr* genes, except for *K. variicola* H77 where no expression was detected. Interestingly, we have not detected any expression of *mcr-1* genes for *E. coli* 45 following bacterial treatment with lacticaseicin 30-colistin combination at a sub-inhibitory concentration. Of note, with this combination, in the cases of *E. coli* H66 and *S. enterica* Typhimurium H97, *E. cloacae* H51, *K. variicola* H77, a very low level of expression was detected.





**Figure 3.** Expression of *mcr-1* or *mcr-9* gene (*mcr-1* or *mcr-9*) following bacterial treatment with colistin, lactacaseicin 30 or their combination at sub-inhibitory concentrations (MIC/2). qPCR assays performed in strains for which a synergistic interaction between lactacaseicin 30-colistin has been evidenced. Furthermore, the 16S rRNA gene was used as internal control as house-keeping gene. Three biological and technical replicates of each reaction were performed. The error bars represent a standard deviation of these replicates.

### 3. Discussion

Aging antibiotics are currently facing ferocious resistance exerted mainly by Gram-negative bacteria, as reported in the WHO top list in 2017. This situation is considered to be a preoccupant latent crisis in the health sector worldwide [29,30]. The spreading of multiresistant pathogenic bacteria in the healthcare units impairs therapeutic options [31]. This situation is anticipated to swell and for this reason, the WHO as well as national health authorities called for global strategies to alleviate this crisis [32,33]. Colistin, which is a particular antibiotic from the polymyxins group was largely used to treat infections due to Gram-negative bacilli [34]. This antibiotic was withdrawn from the human therapeutic circuit because of its associated secondary effects such as its nephrotoxicity [35]. Nonetheless, the usage of colistin remained unmodified in the veterinary medicine, until very recently [36]. Colistin, designed also as an “old” antibiotic, is reintroduced in the therapeutic treatments as a last chance option in case of many infections associated with multiresistant and recalcitrant Gram-negative bacilli [24,34]. Resistance to colistin was usually attributed to mutations occurring on the DNA chromosome [37]. Nonetheless, in 2016, Liu et al. [38] reported the plasmid-borne transferable mobile colistin resistance (*mcr*) gene, which induces a modification of the lipid A on the lipopolysaccharides (LPS) [39]. After which, a rainbow of *mcr* genes were reported in species such as *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Moraxella* and *Acinetobacter baumannii*. The presence of genes designated *mcr-1* to *mcr-10* represent the risk of exacerbating this crisis [40,41]. Within the panel of innovative strategies expected to tackle AMR, the usage of AMP such as bacteriocins offers a novel hope [42,43].

In light of this, we establish in this work that lacticaseicin 30, a novel class II bacteriocin is active against a set of clinical Gram-negative pathogens, and potentiates the activity of colistin on strain carrying *mcr-1* and *mcr-9* genes, including multiresistant *E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella* and *Enterobacter*. Remarkably, clinical Gram-negative strains displaying sensitivity to lacticaseicin 30 are also characterized by the presence of an AmpC phenotype, due to a mutation of the beta-lactamase promoter [27]. Moreover, some of these strains exhibited ESBLs. This heterogeneous family of bacterial enzymes, discovered during the 1980s in Europe [44], are encoded by genes located on plasmids, or could result from a mutation of a natural gene, thus leading to a synthesis of TEM- and SHV- modified enzymes [45,46]. Mutations responsible for ESBLs broaden the spectrum of these enzymes and, therefore, allow the hydrolysis of a wide variety of antibiotics (penicillin monobactams and cephalosporins of third generation such as ceftazidime and cefotaxime [47,48]. This resistance was reported as being frequently associated with the resistance to fluoroquinolones [47]. The increased rate of infections associated with ESBL-bearing bacteria constitutes a therapeutic challenge, as only cephalosporins or quinolones are recommended [46,48]. In the present study, we report synergistic interactions between lacticaseicin 30 and colistin, and clinical strains evaluated as resistant to colistin have seen their breakpoints decreased, thus becoming sensitive to such antibiotics, except for *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* and *S. enterica* Enteritidis ones. The mode of action of both antimicrobials remains to be elucidated, although a mode of action organized in two steps could be claimed. In a former study [20], we reported that bacteriocins produced by *L. paracasei* CNCM I-5369 are not explicitly targeting the LPS of Gram-negatives, but colistin uses LPS to undergo its activity. Therefore, lacticaseicin 30 could take advantage from a potential breach caused by colistin, to proceed with its own activity on the cell-membrane or inside the bacterial cell by cooperative mode of action. Indeed, colistin have a well-known mode of action, disturbing the outer cell membrane of by displacing  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  divalent cations from the phosphate groups of membrane lipids, leading to leakage of intracellular contents and bacterial death [24,49], whereas bacteriocins act generally by pore-forming mode of action provoking permeabilization of the target bacteria cell membrane [8,49]. Synergistic interaction between antimicrobials was reported as an important mean to decrease the number of drugs used, to elude the bacterial resistance and to control any undesirable secondary effect of drugs and finally provide an efficient and affordable therapeutic solution [50]. Related to that, bacteriocins

were shown to potentiate a wide range of molecules including nanoparticles [43]. It should be noted that different combinations of bacteriocins and antibiotics, including colistin were already reported in the literature [49,51–54]. Most of these studied formulations involved the use of nisin as partner of colistin.

Nisin, a class I bacteriocin, is categorized as food additive E234 in the EU under Annex II of Regulation (EC) 1333/2008. This “old” bacteriocin was tested as well with other antibiotics such as tetracycline, methicillin and vancomycin, and the resulting combinations enabled synergistic interactions against multiresistant Gram-positive and Gram-negative pathogenic bacteria [55–58]. Further bacteriocins, such as leaderless enterocin 14 (Ent DD14) from *Enterococcus faecalis* 14, were shown to potentiate other antibiotics such as methicillin [59] and erythromycin [51] without causing damages on mice microbiota or impairing their main organs such as spleen, liver and colon [60]. The present study provides for the first time an insightful information on the relevancy of alternative strategy combining the lacticaseicin 30 with the colistin, on multiresistant clinical strains harboring the *mcr* gene. Indeed, lacticaseicin 30 or lacticaseicin 30+ colistin enabled a clear downregulation of *mcr-1* or *mcr-9* expression transcript. Similar effects were observed by Zgheib et al. [61] and Belguesmia et al. [59] when assessing the impact of EntDD14 on the expression of genes coding for virulence factors in *Clostridium perfringens* and MRSA-SA1 strains. From the twelve strains considered in this study, ten possess the plasmidic *mcr-1* gene, sharing common regulation features [62]. Of note, the expression of the *mcr-1* gene appears to be closely linked to phosphoesterase encoding gene *pap2*, present downstream of *mcr-1*, forming an *mcr-1-pap2* cassettes in plasmid. The remaining two strains, *E. cloacae* H51 *K. variicola* H77, harbor the *mcr-9* variant which was initially isolated from *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Isolate [63]. Interestingly, as for *mcr-1* gene [64], this new variant was found to be inducible in the presence of sub-inhibitory concentration of colistin [65]. The encoded MCR-9 share 84% of identity with MCR-BG encoded by chromosomic gene harbored by *Buttiauxella gaviniae*, whereas the *mcr-1*, originated from *Moraxella* species, share about 36% of identity [66]. Notably, a putative two-component system corresponding to a histidine kinase sensor (QseC), and its cognate partner (QseB) were found downstream to the *mcr-9* gene and possibly implied in the regulation of this gene. Despite these differences, the combination of lacticaseicin 30 and colistin enabled to downregulate the expression level of both *mcr* genes found in the clinical strains studied. The exact mechanisms by which the bacteriocins could impact the expression level of such genes, coding for antibiotic resistance or virulence factors, remain to be elucidated. The interaction of bacteriocins with promoter region of these genes or disruption of transcription machinery in the target cells could be one of the possible mechanisms implied, which will be the subject of further investigations in direct line with the perspective of this research work.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Bacterial Strains and Culture Conditions

All target strains used in this study and their characteristics are reported in Table 3. These strains were grown in brain heart infusion broth (BHI, Sigma-Aldrich Saint-Louis, MO, USA) at 37 °C without shaking. All pathogenic Gram-negative bacteria were obtained from diseased patients at Lille University Hospital (France), except for *Escherichia coli* ATCC 8739 and *E. coli* 184 used as controls. *E. coli* Rosetta -T7-6his-30 strain (Table 3) was used to produce recombinant lacticaseicin 30. This strain was grown in Luria-Bertani broth (LB) at 37 °C with shaking at 160 rpm [25].

##### 4.2. Antibiotic Susceptibility of Clinical Strains

The antibiogram of each target strain was performed with the VITEK<sup>®</sup> 2 system (Biomerieux, Marcy-l'Étoile, France) using the routinely recommended protocol. The UMIC microplate method (Biocentric, Bandol, France) was used to determine the sensibility of these clinical strains for colistin [67]. For the determination of the ESβL and AmpC

production, we used the MASTDISCS<sup>®</sup> Combi (Mast Group LTD, Bootle, UK), according to the manufacturer indication.

**Table 3.** Bacterial strains used in this work.

Strains	Relevant Characteristics
<i>Escherichia coli</i> Rosetta-T7-6His-030	Producing strain Strain harboring the plasmid carrying the <i>orf030</i> gene, encoding the lacticaseicin 30 [25]
<i>Escherichia coli</i> ATCC8739	Control target strains [20]
<i>Escherichia coli</i> 184	Strain harboring the plasmid carrying the <i>mcr-1</i> gene, responsible for colistin resistance [20]
<i>Enterobacter cloacae</i> H51	Gram-negative clinical target strains This work
<i>Escherichia coli</i> H45	This work
<i>Escherichia coli</i> H52	This work
<i>Escherichia coli</i> H66	This work
<i>Klebsiella oxytoca</i> H40	This work
<i>Klebsiella pneumoniae</i> $\beta$ -lactamase H71	This work
<i>Klebsiella variicola</i> $\beta$ -lactamase H77	This work
<i>Klebsiella pneumoniae</i> $\beta$ -lactamase H79	This work
<i>Klebsiella pneumoniae</i> $\beta$ -lactamase H87	This work
<i>Salmonella enterica</i> Enteritidis H10	This work
<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium H97	This work

#### 4.3. Genomic DNA Extraction

Genomic DNA (gDNA) was extracted from 1 mL of each strain suspension using the “NucleoSpin Microbial DNA” kit from Macherey-Nagel (Düren, Germany), and then was checked on agarose gel electrophoresis [68], and quantified with the NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

#### 4.4. Detection of *mcr* Gene in the Clinical Strains Exhibiting a Colistin Resistant Phenotype

The identification of the type of *mcr* gene, involved in the resistance for colistin resistance, was performed by the polymerase chain reaction (PCR) method, using the appropriate oligonucleotide primers listed in Table 4. Each PCR reaction was realized in a final volume of 25  $\mu$ L, containing 12.5  $\mu$ L of DreamTaq PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific), 1.25  $\mu$ L of each appropriate oligonucleotide primer (10  $\mu$ M), 8  $\mu$ L of nuclease free water and 2  $\mu$ L of gDNA. The PCR program consisted in the following steps: 1 cycle of denaturation at 94  $^{\circ}$ C for 15 min, followed by 30 cycles of denaturation at 94  $^{\circ}$ C for 30 s, annealing at melting temperature ( $T_m$ , Table 4) for 30 s and elongation at 72  $^{\circ}$ C for 60 s, and a final cycle of elongation at 72  $^{\circ}$ C for 10 min.

#### 4.5. Random Amplification of Polymorphic DNA PCR (RAPD PCR)

The R1247 (AAGAGCCCGT) and R1283 (GCGATCCCCA) oligonucleotide primers (Table 4) were used to establish the genetic profiles of *E. coli* strains, [71]. The RAPD4 (AAGACGCCGT) oligonucleotide primer (Table 4) was used to identify and select distinct *Klebsiella* strains [72], and the OPP-16 (CCAAGCTGCC) and OPP-11 (AGTCGGGTGG) oligonucleotide primers (Table 4) permitted to identify and select the distinct *Salmonella* strains [73] and discard redundant ones. The RAPD-PCR reaction was performed in a final volume of 25  $\mu$ L containing 12.5  $\mu$ L of DreamTaq PCR Master Mix (2X), 2  $\mu$ L of appropriate primer (10  $\mu$ M), 8.5  $\mu$ L of nuclease-free water, and 2  $\mu$ L of gDNA. The PCR program started with a first step of 10 min at 95  $^{\circ}$ C, followed by 40 cycles of denaturation at 95  $^{\circ}$ C for 1 min, annealing at 38/36  $^{\circ}$ C for 1 min and elongation at 72  $^{\circ}$ C for 2 min. Finally, a second extension step of 10 min at 72  $^{\circ}$ C was performed.

#### 4.6. Production and Purification of Recombinant Lacticaseicin 30

To produce a recombinant lacticaseicin 30, a preculture of *E. coli* Rosetta-T7-6his-030, harboring the plasmid carrying the gene coding for lacticaseicin 30 (*orf030*) was used to inoculate 1% (*v/v*) of LB broth supplemented with 100  $\mu$ g/mL of ampicillin (Sigma-

Aldrich). Expression of lacticaseicin 30 was induced by the addition of 0.5 mM isopropyl  $\beta$ -d-1-thiogalactopyranosid (IPTG, Sigma-Aldrich) and cells were incubated for three additional hours at 37 °C with shaking at 160 rpm. Cells were collected by centrifugation (10 min, 11,000 $\times$  g at 4 °C), and re-suspended in Tris–HCl buffer containing 20 mM Tris–HCl pH 8 and 300 mM NaCl. To recover the soluble recombinant bacteriocin fraction from the cytoplasm, cells were lysed by sonication three times during 40 s at 180 Watt (OmniRuptor 4000 Ultrasonic Homogenizer, Omni International, Georgia, GA, USA). After their lysis, the bacteriocin was purified by the Ni-NTA chromatography as recently reported by Madi-Moussa et al. [25]. The histidine tag was removed with Tev protease (Sigma-Aldrich) following the recommended instructions. The purity of the bacteriocin was checked on Tricine-SDS-PAGE [74]. After purification, the final concentration of lacticaseicin 30 was determined using the bicinchoninic acid assay protein kit (BCA, Sigma-Aldrich).

**Table 4.** Oligonucleotide primers used in this study and their target gene.

Target Gene	Name	Sequence 5' → 3'	Tm (°C)	Size (bp)	References
<b>Primers used for <i>mcr</i> gene detection</b>					
<i>mcr-1</i>	F- <i>mcr-1</i>	AGTCCGTTTGTCTTGTGGC	58	320	[69]
	R- <i>mcr-1</i>	AGATCCTTGGTCTCGGCTTG			
<i>mcr-2</i>	F- <i>mcr-2</i>	CAAGTGTGTTGGTTCGCAGTT	58	715	[69]
	R- <i>mcr-2</i>	TCTAGCCCCGACAAGCATACC			
<i>mcr-3</i>	F- <i>mcr-3</i>	AAATAAAAATTGTTCCGCTTATG	58	929	[69]
	R- <i>mcr-3</i>	AATGGAGATCCCCGTTTTT			
<i>mcr-4</i>	F- <i>mcr-4</i>	TCACTTTCATCACTGCGTTG	58	1116	[69]
	R- <i>mcr-4</i>	TTGGTCCATGACTACCAATG			
<i>mcr-5</i>	F- <i>mcr-5</i>	ATGCGGTTGTCTGCATTTATC	58	1644	[69]
	R- <i>mcr-5</i>	TCATTGTGGTTGTCTTTTCTG			
<i>mcr-6</i>	F- <i>mcr-6</i>	AGCTATGTCAATCCCGTGAT	52	252	[70]
	R- <i>mcr-6</i>	ATTGGCTAGGTTGTCAATC			
<i>mcr-7</i>	F- <i>mcr-7</i>	GCCCTTCTTTTCGTTGTT	50	551	[70]
	R- <i>mcr-7</i>	GGTTGGTCTCTTTCTCGT			
<i>mcr-8</i>	F- <i>mcr-8</i>	TCAACAATTCTACAAAGCGTG	53	856	[70]
	R- <i>mcr-8</i>	AATGCTGCGGAATGAAG			
<i>mcr-9</i>	F- <i>mcr-9</i>	TTCCCTTGTCTGTTG	55	1011	[70]
	R- <i>mcr-9</i>	GCAGGTAATAAGTCGGTC			
<i>mcr-10</i>	F- <i>mcr-10</i>	GGACCGACCTATTACCAGCG	64		[41]
	R- <i>mcr-10</i>	GGCATTATGCTGCAGACACG			
<b>Primers used for qPCR analyses</b>					
<i>mcr-1</i>	F- <i>mcr-1</i> -qPCR	CGCGATGCTACTGATCACCA	58	100	In this study
	R- <i>mcr-1</i> -qPCR	AAAATAACTGGTCACCGCGC			
<i>mcr-9</i>	F- <i>mcr-9</i> -qPCR	ATCCGTTCCGTGCATGTTCT	58	100	In this study
	R- <i>mcr-9</i> -qPCR	CACCGGTTTCTGCACGATG			
16sRNA	F-16sRNA-qPCR	GTAGGTGGCAAGCGTTATCC	58	101	In this study
	R-16sRNA-qPCR	GATGCGCTTCTCGGTTAAG			

#### 4.7. Determination of Minimal Inhibitory Concentrations (MICs) in Checkerboard Assays

The antimicrobial activity of lacticaseicin 30 was determined using the agar diffusion test method [75]. Interaction between this bacteriocin and colistin were determined with the checkerboard MIC method as previously described by Ahmad et al. [76]. MICs are defined as the lowest concentration of an antimicrobial agent that inhibits the visible growth of a microorganism after an overnight incubation at 37 °C [77]. Given that lacticaseicin 30 is only active at pH 5, BHI broth, colistin sulfate salt (Sigma-Aldrich) and lacticaseicin 30 were acidified to pH 5 with acetic acid (Sigma-Aldrich). Similarly, BHI broth alone (negative control) was also adjusted to pH 5. The checkerboard assay of lacticaseicin 30 and colistin were performed using seven doubling dilutions for each combined component [36]. After that, microplates were inoculated with  $\sim 10^6$  colony forming units/mL of the target strain, in a final volume of 200  $\mu$ L per well, and incubated overnight at 37 °C without agitation.



The fractional inhibitory concentration index (FICI) was calculated for each combination using the following formula:  $FICA + FICB = FICI$ , where  $FICA = MIC$  of drug A in combination/ $MIC$  of drug A alone, and  $FICB = MIC$  of drug B in combination/ $MIC$  of drug B alone. The FICI was interpreted as follows: synergy =  $FICI \leq 0.5$ ; indifference =  $FICI > 0.5 \leq 4$ ; antagonism =  $FICI > 4$  [78].

#### 4.8. Total RNAs Extraction and cDNA Synthesis

Total RNA was extracted from a 5 mL culture of the target strain treated for 24 h with colistin or lacticaseicin 30 or both of them at subinhibitory concentrations ( $MIC/2$ ) using the “NucleoSpin RNA” kit (Macherey-Nagel) and following the recommendations of the manufacturer. After controlling the RNA integrity on agarose gel following an electrophoresis performed at a constant voltage of 120 V for 45 min, 1  $\mu$ g of RNA from each sample was first treated with DNase (Thermo Fisher Scientific) and converted into cDNA using the Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific), following the recommendations of the manufacturer.

#### 4.9. Quantitative PCR (qPCR) and Analysis of *mcr* Genes Expression

Each qPCR reaction containing 12.5  $\mu$ L of Takyon™ No ROX SYBR 2X MasterMix blue dTTP (Eurogentech, Seraing, Belgium), 1.25  $\mu$ L of each appropriate primer (Table 4), 2  $\mu$ L of cDNA and 8  $\mu$ L of nuclease free water, was performed in triplicate using CFX Connect Real-Time PCR Detection System thermocycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The qPCR program consists of an initial step at 95 °C for 10 min followed by 45 cycles of 95 °C for 15 s, 58 °C for 1 min, and 72 °C for 30 s and an additional step starting between 90 °C and 58 °C was performed to establish a melting curve and verify the specificity of amplicon product [79]. Then, the threshold cycle ( $C_t$ ) values for each qPCR reaction were obtained using Bio-Rad’s CFX Manager software. The  $C_t$  value is the basis for the calculation of the relative quantification, corresponding to the expression of the target gene (*mcr* gene) compared with the house-keeping gene (*16S rRNA* gene), as demonstrated in [28]. The analysis of the relative expression of the target genes was determined using the  $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$  method as previously described by [25,80].

## 5. Conclusions

Bacteriocins are produced by a large number of bacterial species including those from the human microbiota [11]. Their immediate application in the human and veterinary health must be considered as a priority. These molecules can be part of the solution for the announced AMR crisis. Bacteriocins can be explored in different ways. First, by favoring their production in situ [11], or as potentiating agent of aging antibiotics as reported in a number of clinical studies. The present study enlarged the portal of bacteriocins as molecules of medical interest and permitted to claim that LAB-bacteriocins can act alone or in combination with colistin against multiresistant Gram-negative bacteria. The in vivo assessment of lacticaseicin 30 alone or in combination with colistin constitutes our next goal.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antibiotics11010020/s1>, Table S1: Antibiograms of clinical Gram-negative bacteria used in this work.

**Author Contributions:** Conceptualization, D.M.-M., Y.B., F.C., D.D.; experimental procedures, D.M.-M., A.C., Y.B.; writing—review and editing, D.M.-M., Y.B., F.C., D.D.; supervision F.C., D.D.; funding acquisition, D.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received funding from the Hauts-de-France region, through ALIBIOTECH CPER/FEDER 2016/2021, Université de Lille, and the grant of Desiré Madi-Moussa.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** The authors are grateful to Isabelle Kempf for the critical reading of the manuscript.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Jim O'Neill. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *15*, 526. [[CrossRef](#)]
2. Goel, N.; Fatima, S.W.; Kumar, S.; Sinha, R.; Khare, S.K. Antimicrobial Resistance in Biofilms: Exploring Marine Actinobacteria as a Potential Source of Antibiotics and Biofilm Inhibitors. *Biotechnol. Rep.* **2021**, *30*, e00613. [[CrossRef](#)]
3. Brinkac, L.; Voorhies, A.; Gomez, A.; Nelson, K.E. The Threat of Antimicrobial Resistance on the Human Microbiome. *Microb. Ecol.* **2017**, *74*, 1001–1008. [[CrossRef](#)]
4. Ventola, C.L. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *Pharm. Ther.* **2015**, *40*, 277–283.
5. Sun, Y.; Kang, C.; Liu, F.; Zhou, Y.; Luo, L.; Qiao, H. RGD Peptide-Based Target Drug Delivery of Doxorubicin Nanomedicine. *Drug Dev. Res.* **2017**, *78*, 283–291. [[CrossRef](#)]
6. Aslam, B.; Wang, W.; Arshad, M.I.; Khurshid, M.; Muzammil, S.; Rasool, M.H.; Nisar, M.A.; Alvi, R.F.; Aslam, M.A.; Qamar, M.U.; et al. Antibiotic Resistance: A Rundown of a Global Crisis. *Infect. Drug Resist.* **2018**, *11*, 1645–1658. [[CrossRef](#)]
7. Naghmouchi, K.; Drider, D.; Fliss, I. Action of Divergicin M35, a Class IIa Bacteriocin, on Liposomes and *Listeria*. *J. Appl. Microbiol.* **2007**, *102*, 1508–1517. [[CrossRef](#)]
8. Drider, D.; Rebuffat, S. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*; Springer Science & Business Media: Berlin/Heidelberg, Germany, 2011; ISBN 978-1-4419-7692-5.
9. Hammami, R.; Fernandez, B.; Lacroix, C.; Fliss, I. Anti-Infective Properties of Bacteriocins: An Update. *Cell Mol. Life Sci.* **2013**, *70*, 2947–2967. [[CrossRef](#)]
10. Flaherty, R.A.; Freed, S.D.; Lee, S.W. The Wide World of Ribosomally Encoded Bacterial Peptides. *PLoS Pathog.* **2014**, *10*, e1004221. [[CrossRef](#)]
11. Drider, D. Gut Microbiota Is an Important Source of Bacteriocins and Their In Situ Expression Can Be Explored for Treatment of Bacterial Infections. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2021**, *13*, 1759–1765. [[CrossRef](#)]
12. Cotter, P.D.; Ross, R.P.; Hill, C. Bacteriocins—A Viable Alternative to Antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11*, 95–105. [[CrossRef](#)]
13. Kumariya, R.; Garsa, A.K.; Rajput, Y.S.; Sood, S.K.; Akhtar, N.; Patel, S. Bacteriocins: Classification, Synthesis, Mechanism of Action and Resistance Development in Food Spoilage Causing Bacteria. *Microb. Pathog.* **2019**, *128*, 171–177. [[CrossRef](#)]
14. Drider, D.; Fimland, G.; Hechard, Y.; McMullen, L.M.; Prevost, H. The Continuing Story of Class IIa Bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2006**, *70*, 564–582. [[CrossRef](#)]
15. Soltani, S.; Hammami, R.; Cotter, P.D.; Rebuffat, S.; Said, L.B.; Gaudreau, H.; Bédard, F.; Biron, E.; Drider, D.; Fliss, I. Bacteriocins as a New Generation of Antimicrobials: Toxicity Aspects and Regulations. *FEMS Microbiol. Rev.* **2021**, *45*, fuaa039. [[CrossRef](#)]
16. Alvarez-Sieiro, P.; Montalbán-López, M.; Mu, D.; Kuipers, O.P. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Extending the Family. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 2939–2951. [[CrossRef](#)]
17. Pérez-Ramos, A.; Madi-Moussa, D.; Coucheney, F.; Drider, D. Current Knowledge of the Mode of Action and Immunity Mechanisms of LAB-Bacteriocins. *Microorganisms* **2021**, *9*, 2107. [[CrossRef](#)]
18. 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.; Seal, B.S. 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.* **2006**, *50*, 3111–3116. [[CrossRef](#)]
19. Messaoudi, S.; Kergourlay, G.; Dalgalarondo, M.; Choiset, Y.; Ferchichi, M.; Prévost, H.; Pilet, M.-F.; Chobert, J.-M.; Manai, M.; Dousset, X. Purification and Characterization of a New Bacteriocin Active against *Campylobacter* Produced by *Lactobacillus Salivarius* SMXD51. *Food Microbiol.* **2012**, *32*, 129–134. [[CrossRef](#)]
20. Belguesmia, Y.; Hazime, N.; Kempf, I.; Boukherroub, R.; Drider, D. New Bacteriocins from *Lactocaseibacillus Paracasei* CNCM I-5369 Adsorbed on Alginate Nanoparticles Are Very Active against *Escherichia Coli*. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8654. [[CrossRef](#)]
21. Raetz, C.R.H.; Whitfield, C. Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 635–700. [[CrossRef](#)]
22. Vaara, M. Agents That Increase the Permeability of the Outer Membrane. *Microbiol. Rev.* **1992**, *56*, 395–411. [[CrossRef](#)]
23. Ayoub Moubareck, C. Polymyxins and Bacterial Membranes: A Review of Antibacterial Activity and Mechanisms of Resistance. *Membranes* **2020**, *10*, 181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Bialvaei, A.Z.; Samadi Kafil, H. Colistin, Mechanisms and Prevalence of Resistance. *Curr. Med. Res. Opin.* **2015**, *31*, 707–721. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Madi-Moussa, D.; Coucheney, F.; Drider, D. Expression of Five Class II Bacteriocins with Activity against *Escherichia Coli* in *Lactocaseibacillus Paracasei* CNCM I-5369, and in a Heterologous Host. *Biotechnol. Rep.* **2021**, *30*, e00632. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Weldhagen, G.F.; Poirel, L.; Nordmann, P. Ambler Class A Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in *Pseudomonas Aeruginosa*: Novel Developments and Clinical Impact. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 2385–2392. [[CrossRef](#)]
27. Meini, S.; Tascini, C.; Cei, M.; Sozio, E.; Rossolini, G.M. AmpC  $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacterales: What a Clinician Should Know. *Infection* **2019**, *47*, 363–375. [[CrossRef](#)]
28. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [[CrossRef](#)]

29. De Kraker, M.E.A.; Stewardson, A.J.; Harbarth, S. Will 10 Million People Die a Year Due to Antimicrobial Resistance by 2050? *PLoS Med.* **2016**, *13*, e1002184. [[CrossRef](#)]
30. O'Neill, J. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. *Rev. Antimicrob. Resist.* **2016**, 1–84.
31. Friedman, N.D.; Temkin, E.; Carmeli, Y. The Negative Impact of Antibiotic Resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* **2016**, *22*, 416–422. [[CrossRef](#)]
32. World Health Organization. *Global Action Plan on Antimicrobial Resistance*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2015; ISBN 978-92-4-150976-3.
33. European Union EU. Action on Antimicrobial Resistance. Available online: [https://ec.europa.eu/health/antimicrobial-resistance/eu-action-on-antimicrobial-resistance\\_en](https://ec.europa.eu/health/antimicrobial-resistance/eu-action-on-antimicrobial-resistance_en) (accessed on 19 October 2021).
34. Hamel, M.; Rolain, J.-M.; Baron, S.A. The History of Colistin Resistance Mechanisms in Bacteria: Progress and Challenges. *Microorganisms* **2021**, *9*, 442. [[CrossRef](#)]
35. Jafari, F.; Elyasi, S. Prevention of Colistin Induced Nephrotoxicity: A Review of Preclinical and Clinical Data. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **2021**, *14*, 1113–1131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Lhermie, G.; la Ragione, R.M.; Weese, J.S.; Olsen, J.E.; Christensen, J.P.; Guardabassi, L. Indications for the Use of Highest Priority Critically Important Antimicrobials in the Veterinary Sector. *J. Antimicrob. Chemother.* **2020**, *75*, 1671–1680. [[CrossRef](#)]
37. Olaitan, A.O.; Morand, S.; Rolain, J.-M. Mechanisms of Polymyxin Resistance: Acquired and Intrinsic Resistance in Bacteria. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 643. [[CrossRef](#)]
38. Liu, Y.-Y.; Wang, Y.; Walsh, T.R.; Yi, L.-X.; Zhang, R.; Spencer, J.; Doi, Y.; Tian, G.; Dong, B.; Huang, X.; et al. Emergence of Plasmid-Mediated Colistin Resistance Mechanism MCR-1 in Animals and Human Beings in China: A Microbiological and Molecular Biological Study. *Lancet Infect. Dis.* **2016**, *16*, 161–168. [[CrossRef](#)]
39. Gao, R.; Hu, Y.; Li, Z.; Sun, J.; Wang, Q.; Lin, J.; Ye, H.; Liu, F.; Srinivas, S.; Li, D.; et al. Dissemination and Mechanism for the MCR-1 Colistin Resistance. *PLoS Pathog.* **2016**, *12*, e1005957. [[CrossRef](#)]
40. Gharaibeh, M.H.; Shatnawi, S.Q. An Overview of Colistin Resistance, Mobilized Colistin Resistance Genes Dissemination, Global Responses, and the Alternatives to Colistin: A Review. *Vet. World* **2019**, *12*, 1735. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Lei, C.-W.; Zhang, Y.; Wang, Y.-T.; Wang, H.-N. Detection of Mobile Colistin Resistance Gene Mcr-10.1 in a Conjugative Plasmid from *Enterobacter Roggenkampii* of Chicken Origin in China. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64*, e01191-20. [[CrossRef](#)]
42. Chikindas, M.L.; Weeks, R.; Drider, D.; Chistyakov, V.A.; Dicks, L.M. Functions and Emerging Applications of Bacteriocins. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2018**, *49*, 23–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Zgheib, H.; Drider, D.; Belguesmia, Y. Broadening and Enhancing Bacteriocins Activities by Association with Bioactive Substances. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 7835. [[CrossRef](#)]
44. Cantón, R.; Novais, A.; Valverde, A.; Machado, E.; Peixe, L.; Baquero, F.; Coque, T.M. Prevalence and Spread of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* **2008**, *14*, 144–153. [[CrossRef](#)]
45. Bradford, P.A. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clin. Microbiol. Rev.* **2001**, *14*, 933–951. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Castanheira, M.; Simner, P.J.; Bradford, P.A. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: An Update on Their Characteristics, Epidemiology and Detection. *JAC Antimicrob. Resist.* **2021**, *3*, dlab092. [[CrossRef](#)]
47. Paterson, D.L.; Bonomo, R.A. Extended-Spectrum Beta-Lactamases: A Clinical Update. *Clin. Microbiol. Rev.* **2005**, *18*, 657–686. [[CrossRef](#)]
48. Ghafourian, S.; Sadeghifard, N.; Soheili, S.; Sekawi, Z. Extended Spectrum Beta-Lactamases: Definition, Classification and Epidemiology. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2015**, *17*, 11–21. [[PubMed](#)]
49. Field, D.; Seisling, N.; Cotter, P.D.; Ross, R.P.; Hill, C. Synergistic Nisin-Polymyxin Combinations for the Control of *Pseudomonas* Biofilm Formation. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1713. [[CrossRef](#)]
50. Xu, X.; Xu, L.; Yuan, G.; Wang, Y.; Qu, Y.; Zhou, M. Synergistic Combination of Two Antimicrobial Agents Closing Each Other's Mutant Selection Windows to Prevent Antimicrobial Resistance. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 7237. [[CrossRef](#)]
51. Al Atya, A.K.; Belguesmia, Y.; Chataigne, G.; Ravallec, R.; Vachée, A.; Szunerits, S.; Boukherroub, R.; Drider, D. Anti-MRSA Activities of Enterocins DD28 and DD93 and Evidences on Their Role in the Inhibition of Biofilm Formation. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 817. [[CrossRef](#)]
52. Naghmouchi, K.; Belguesmia, Y.; Baah, J.; Teather, R.; Drider, D. Antibacterial Activity of Class I and IIa Bacteriocins Combined with Polymyxin E against Resistant Variants of *Listeria Monocytogenes* and *Escherichia Coli*. *Res. Microbiol.* **2011**, *162*, 99–107. [[CrossRef](#)]
53. Naghmouchi, K.; Baah, J.; Hober, D.; Jouy, E.; Rubrecht, C.; Sané, F.; Drider, D. Synergistic Effect between Colistin and Bacteriocins in Controlling Gram-Negative Pathogens and Their Potential to Reduce Antibiotic Toxicity in Mammalian Epithelial Cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 2719–2725. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Jorge, P.; Pérez-Pérez, M.; Pérez Rodríguez, G.; Pereira, M.O.; Lourenço, A. A Network Perspective on Antimicrobial Peptide Combination Therapies: The Potential of Colistin, Polymyxin B and Nisin. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2017**, *49*, 668–676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Balto, H.A.; Shakoob, Z.A.; Kanfar, M.A. Combined Effect of a Mixture of Tetracycline, Acid, and Detergent, and Nisin against *Enterococcus Faecalis* and *Actinomyces Viscosus* Biofilms. *Saudi Med. J.* **2015**, *36*, 211–215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



56. Mathur, H.; Field, D.; Rea, M.C.; Cotter, P.D.; Hill, C.; Ross, R.P. Bacteriocin-Antimicrobial Synergy: A Medical and Food Perspective. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1205. [[CrossRef](#)]
57. Ellis, J.-C.; Ross, R.P.; Hill, C. Nisin Z and Lacticin 3147 Improve Efficacy of Antibiotics against Clinically Significant Bacteria. *Future Microbiol.* **2019**, *14*, 1573–1587. [[CrossRef](#)]
58. Angelopoulou, A.; Field, D.; Pérez-Ibarreche, M.; Warda, A.K.; Hill, C.; Ross, R.P. Vancomycin and Nisin A Are Effective against Biofilms of Multi-Drug Resistant Staphylococcus Aureus Isolates from Human Milk. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0233284. [[CrossRef](#)]
59. Belguesmia, Y.; Spano, G.; Drider, D. Potentiating Effects of Leaderless Enterocin DD14 in Combination with Methicillin on Clinical Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus S1 Strain. *Microbiol. Res.* **2021**, *252*, 126864. [[CrossRef](#)]
60. Bendjeddou, K.; Hamma-Faradji, S.; Meddour, A.A.; Belguesmia, Y.; Cudennec, B.; Bendali, F.; Daube, G.; Taminiau, B.; Drider, D. Gut Microbiota, Body Weight and Histopathological Examinations in Experimental Infection by Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus: Antibiotic versus Bacteriocin. *Benef. Microbes* **2021**, *12*, 295–305. [[CrossRef](#)]
61. Zgheib, H.; Belguesmia, Y.; Boukherroub, R.; Drider, D. Alginate Nanoparticles Enhance Anti-Clostridium Perfringens Activity of the Leaderless Two-Peptide Enterocin DD14 and Affect Expression of Some Virulence Factors. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2021**, *4*, 1213–1227. [[CrossRef](#)]
62. Ling, Z.; Yin, W.; Shen, Z.; Wang, Y.; Shen, J.; Walsh, T.R. Epidemiology of Mobile Colistin Resistance Genes Mcr-1 to Mcr-9. *J. Antimicrob. Chemother.* **2020**, *75*, 3087–3095. [[CrossRef](#)]
63. Carroll, L.M.; Gaballa, A.; Guldemann, C.; Sullivan, G.; Henderson, L.O.; Wiedmann, M. Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene Mcr-9 in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible Salmonella Enterica Serotype Typhimurium Isolate. *mBio* **2019**, *10*, e00853-19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Zhou, K.; Luo, Q.; Wang, Q.; Huang, C.; Lu, H.; Rossen, J.W.A.; Xiao, Y.; Li, L. Silent Transmission of an IS1294b-Deactivated Mcr-1 Gene with Inducible Colistin Resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2018**, *51*, 822–828. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Kieffer, N.; Royer, G.; Decousser, J.-W.; Bourrel, A.-S.; Palmieri, M.; Ortiz de la Rosa, J.-M.; Jacquier, H.; Denamur, E.; Nordmann, P.; Poirel, L. Mcr-9, an Inducible Gene Encoding an Acquired Phosphoethanolamine Transferase in Escherichia Coli, and Its Origin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e00965-19. [[CrossRef](#)]
66. Kieffer, N.; Nordmann, P.; Poirel, L. Moraxella Species as Potential Sources of MCR-like Polymyxin Resistance Determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e00129-17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Bardet, L.; Okdah, L.; le Page, S.; Baron, S.A.; Rolain, J.-M. Comparative Evaluation of the UMIC Colistine Kit to Assess MIC of Colistin of Gram-Negative Rods. *BMC Microbiol.* **2019**, *19*, 60. [[CrossRef](#)]
68. Sambrook, J.; Russell, D.W. Agarose Gel Electrophoresis. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2006**, *2006*, pdb.prot4020. [[CrossRef](#)]
69. Li, J.; Koh, J.-J.; Liu, S.; Lakshminarayanan, R.; Verma, C.S.; Beuerman, R.W. Membrane Active Antimicrobial Peptides: Translating Mechanistic Insights to Design. *Front. Neurosci.* **2017**, *11*, 73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Borowiak, M.; Baumann, B.; Fischer, J.; Thomas, K.; Deneke, C.; Hammerl, J.A.; Szabo, I.; Malorny, B. Development of a Novel Mcr-6 to Mcr-9 Multiplex PCR and Assessment of Mcr-1 to Mcr-9 Occurrence in Colistin-Resistant Salmonella Enterica Isolates from Environment, Feed, Animals and Food (2011–2018) in Germany. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 80. [[CrossRef](#)]
71. Nielsen, K.L.; Godfrey, P.A.; Stegger, M.; Andersen, P.S.; Feldgarden, M.; Frimodt-Møller, N. Selection of Unique Escherichia Coli Clones by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD): Evaluation by Whole Genome Sequencing. *J. Microbiol. Methods* **2014**, *103*, 101–103. [[CrossRef](#)]
72. Deschaght, P.; van Simaey, L.; Decat, E.; van Mechelen, E.; Brisse, S.; Vaneechoutte, M. Rapid Genotyping of Achromobacter Xylosoxidans, Acinetobacter Baumannii, Klebsiella Pneumoniae, Pseudomonas Aeruginosa and Stenotrophomonas Maltophilia Isolates Using Melting Curve Analysis of RAPD-Generated DNA Fragments (McRAPD). *Res. Microbiol.* **2011**, *162*, 386–392. [[CrossRef](#)]
73. Albufera, U.; Bhugaloo-Vial, P.; Issack, M.I.; Jaufeerally-Fakim, Y. Molecular Characterization of Salmonella Isolates by REP-PCR and RAPD Analysis. *Infect. Genet. Evol.* **2009**, *9*, 322–327. [[CrossRef](#)]
74. Schägger, H. Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 16–22. [[CrossRef](#)]
75. Tagg, J.R.; McGiven, A.R. Assay System for Bacteriocins. *Appl. Microbiol.* **1971**, *21*, 943. [[CrossRef](#)]
76. Ahmad, V.; Khan, M.S.; Jamal, Q.M.S.; Alzohairy, M.A.; Al Karaawi, M.A.; Siddiqui, M.U. Antimicrobial Potential of Bacteriocins: In Therapy, Agriculture and Food Preservation. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2017**, *49*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Wiegand, I.; Hilpert, K.; Hancock, R.E.W. Agar and Broth Dilution Methods to Determine the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of Antimicrobial Substances. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 163–175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Petersen, P.J.; Labthavikul, P.; Jones, C.H.; Bradford, P.A. In Vitro Antibacterial Activities of Tigecycline in Combination with Other Antimicrobial Agents Determined by Checkerboard and Time-Kill Kinetic Analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**, *57*, 573–576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Postollec, F.; Falentin, H.; Pavan, S.; Combrisson, J.; Sohier, D. Recent Advances in Quantitative PCR (QPCR) Applications in Food Microbiology. *Food Microbiol.* **2011**, *28*, 848–861. [[CrossRef](#)]
80. Hurtado, A.; Reguant, C.; Bordons, A.; Rozès, N. Expression of Lactobacillus Pentosus B96 Bacteriocin Genes under Saline Stress. *Food Microbiol.* **2011**, *28*, 1339–1344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Discussion générale**

General discussion

*Lactocaseibacillus paracasei* CNCM I-5369 possédant une activité dirigée contre les bactéries à Gram-négatif, incluant des souches d'*E. coli* résistantes à la colistine, a été isolée à partir d'un produit laitier d'origine algérienne. En effet, le surnageant de culture semi-purifié de cette souche, appelé également produit E20, a révélé une activité dirigée à la fois contre des bactéries à Gram négatif (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella enterica*) et les bactéries à Gram-positif (*Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*) à un pH compris entre 4,5 et 5 (Belguesmia et al., 2020b). Cette activité antimicrobienne résulte de l'action des molécules de nature protéique couplée à un pH acide. Nous noterons que lorsque le pH est inférieur à 4,5 l'activité est seulement due à l'action du pH acide. La quantité des peptides présents dans la fraction E20 est très faible et est difficile à purifier. Pour cela, nous avons choisi d'identifier les bactériocines potentiellement produites par cette souche en utilisant une approche bioinformatique. Ainsi, l'analyse *in silico* du génome de *L. paracasei* CNCM I-5369 à l'aide de l'outil Bagel-3, a permis d'identifier cinq gènes codant pour des bactériocines de classe II (*orf010*, *orf012*, *orf023*, *orf030* et *orf038*).

Ces cinq bactériocines, nommées dans un premier temps ORF010, ORF012, ORF023, ORF030 et ORF038, ne présentent aucune homologie de séquence entre elles, excepté la bactériocine ORF023 qui présente un pourcentage d'identité de séquence de 56% avec la bactériocine ORF012 et un pourcentage de « query coverage » (correspondant à la séquence initiale retenue par l'alignement local) de 41%. Par ailleurs, ces bactériocines présentent très peu d'homologie de séquence avec d'autres bactériocines appartenant à la classe II. Par exemple, les bactériocines ORF010 et ORF023 montrent quelques homologies de séquence avec l'entérotoxine X (classe II-b), la bactériocine ORF012 avec la plantaricine NC8 (II-b), la bactériocine ORF030 avec la carnocine CP52 (classe II-a) et la bactériocine ORF038 avec la thermophiline 13 (classe II). L'analyse *in silico* a révélé que les gènes *orf023*, *orf030* et *orf038* possèdent leurs propres régions régulatrices, tandis que les gènes *orf010* et *orf012* semblent être régulés par le même promoteur. Par ailleurs, l'expression des cinq gènes de bactériocines, observée à la fin de la phase exponentielle de croissance, après 24 h de croissance, est corrélée avec l'activité antimicrobienne indiquant un lien possible entre l'expression des gènes et la production des bactériocines, comme cela a été rapporté pour d'autres systèmes de régulation (Hurtado et al., 2011; Chanos and Mygind, 2016; Renye et al., 2016). De plus, les résultats obtenus lors de l'analyse de la RT-qPCR ont montré une co-expression des gènes *orf010* et *orf012*, confirmant l'existence d'un promoteur commun pour ces deux gènes. Ces résultats indiquent que les bactériocines ORF010 et ORF012 formeraient une bactériocine à deux

peptides comme cela a été observé chez différentes autres bactériocines (Rogne et al., 2008; Acedo et al., 2017; Ekblad and Kristiansen, 2019).

Après avoir analysé l'expression des cinq gènes de bactériocine identifiés chez *L. paracasei* CNCM I-5369 en système natif, nous avons décidé de les exprimer en système hétérologue dans le but d'améliorer leurs rendements de production. En effet, la production hétérologue des bactériocines est plus avantageuse car les gènes codant pour ces bactériocines sont placés sous le contrôle de promoteurs inductibles et les conditions de croissance peuvent être contrôlées. De plus, les quantités obtenues sont supérieures à celles produites par la souche native (Richard et al., 2004; Mesa-Pereira et al., 2018). Les systèmes d'expression utilisés pour exprimer les cinq bactériocines identifiées par le logiciel Bagel-3 sont *E. coli* Rosetta DE3 et *E. coli* BL21. Il s'est avéré que la production des cinq bactériocines est plus élevée chez *E. coli* Rosetta DE3. Ceci pourrait être lié au fait que la souche *E. coli* Rosetta DE3 contient un plasmide codant des ARNt rares (AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA) (Tripathi, 2016). En effet l'analyse de chaque gène de bactériocine a révélé la présence de codons rares (AGG, AGA, CGG, CGA, AUA, CUA, CCC et GGA) qui peuvent affecter leurs traductions en acides aminés en système hétérologue (Papaneophytou and Kontopidis, 2014). Bien que les cinq bactériocines soient exprimées chez *E. coli* Rosetta, seule la bactériocine ORF030 a été produite en grande quantité (1 mg de peptide pour 100 ml de production) dans la fraction soluble après plusieurs étapes de purification. Les autres bactériocines sont restées piégées dans la fraction insoluble. Dans certains cas, la surexpression des protéines recombinantes peut être toxique pour l'hôte *E. coli* conduisant à la formation de corps d'inclusion inactifs contenant les protéines recombinantes non repliées (Fahnert et al., 2004). Dans d'autre cas, la formation des corps d'inclusion peut être avantageuse pour la purification des bactériocines car ces structures les protègent des protéases de l'hôte (Mesa-Pereira et al., 2018). Afin de récupérer les bactériocines piégées dans les corps d'inclusions, ces dernières ont été resolubilisées avec une solution à 4 M d'urée. Le traitement à l'urée à des concentrations très élevées peut, cependant, entraîner une dénaturation des structures secondaires des protéines et donc empêcher leurs agrégations (Singh et al., 2015). Après le traitement à l'urée, les bactériocines récupérées ont été renaturées lors d'une ultime étape de purification par chromatographie d'affinité Ni-NTA. Nous noterons que les masses moléculaires des cinq bactériocines purifiées obtenues (par spectrophotométrie de masse MALDI-TOF), sont similaires à leurs masses théoriques déterminées à l'aide du logiciel ExPasy, indiquant que ces bactériocines ne subissent pas d'étape de maturation au cours de leur biosynthèse, et ne sont donc pas à considérer comme des RiPPs.

Après plusieurs étapes de purifications, l'activité contre les bactéries à Gram-négatif des cinq bactériocines recombinantes a été établie contre *E. coli* ATCC 8739. L'activité antibactérienne observée résulte de l'action combinée entre les bactériocines et un pH acide ( $4,5 \leq \text{pH} \leq 5$ ), comme cela a été rapporté pour d'autres bactériocines (Yang and Ray, 1994; Houlihan et al., 2004). De plus une activité synergique a été observée lorsque les cinq bactériocines sont testées simultanément.

En se référant à la classification proposée par Alvarez-Sieiro et al. (2016), les bactériocines produites par *L. paracasei* CNCM I-5369 semblent appartenir à la classe IIc, et sont aussi dépourvues de peptide leader, laissant à penser qu'elles sont synthétisées directement sous leurs formes actives et ne subissent pas d'étape de maturation ni de modification post-traductionnelle. En outre, la co-expression des bactériocines ORF010 et ORF012 ainsi que leur activité antibactérienne synergique semblent indiquer que ces deux bactériocines constituent une bactériocine leaderless à deux peptides (Cintas et al., 1998; Neira et al., 2010). Il a été rapporté que les bactériocines appartenant à la classe IIc perturbent la membrane cytoplasmique de leurs cibles et que la plupart d'entre elles n'avaient pas besoin d'une molécule d'ancrage à la membrane pour initier leurs fonctions antibactériennes (Uzelac et al., 2013; Pérez-Ramos et al., 2021).

La bactériocine ORF030, renommée par la suite lacticaséicine 30, est celle la plus aisément produite en quantité en système hétérologue parmi les cinq bactériocines. Pour la suite de nos travaux, nous avons décidé de nous focaliser sur cette bactériocine afin de mieux comprendre la relation entre sa structure et son activité contre les bactéries à Gram-négatif. Il convient de rappeler que les bactériocines produites par les BLs et dotées d'une activité anti-Gram-négative sont peu abondantes. La lacticaséicine 30 est constituée de 111 acides aminés mais contient plus d'acides aminés chargés négativement tels l'aspartate et le glutamate, que d'acides aminés chargés positivement telles l'arginine et la lysine. Ces caractéristiques ont déjà été observées pour des peptides antimicrobiens (AMP) produits par des cellules du domaine Eucaryote (*Trichoderma viride*, ruminants...), et ces peptides ont la particularité, à l'instar de la lacticaséicine 30, d'être actifs contre les bactéries à Gram-positif et les bactéries à Gram-négatif. (Epanand and Vogel, 1999; Harris et al., 2009). Le point isoélectrique (pI) théorique de la lacticaséicine 30 est de 6,05 indiquant qu'à pH neutre ( $\text{pH} > \text{pI}$ ), la lacticaséicine 30 reste anionique, alors qu'à pH acide ( $\text{pH} < \text{pI}$ ), elle est cationique, suggérant *in fine* que la molécule est active uniquement lorsqu'elle est chargée positivement. De plus, la lacticaséicine 30 contient de nombreux résidus hydrophobes, comme la majorité des PAM cationiques qui contiennent

également de nombreux résidus hydrophobes. Les résidus cationiques sont supposés interagir avec les lipides bactériens chargés négativement, tandis que les résidus hydrophobes pourraient être impliqués dans la dégradation de la membrane (Clark et al., 2021). Cependant, il est intéressant de rappeler que des expériences visant à tester la fraction semi-purifiée E20, contenant l'ensemble des bactériocines de *L. paracasei* CNCM I-5369 à des faibles quantités, y compris la lacticaséicine 30, sur différentes souches d'*E. coli* présentant ou non des modifications de leur LPS, n'ont pas permis de désigner le LPS comme la cible principale de ces bactériocines de classe II (Belguesmia et al., 2020b).

La prédiction de la structure secondaire de la lacticaséicine 30 à l'aide du logiciel I-Tasser a révélé une structure secondaire caractérisée par la présence de cinq hélices- $\alpha$ . Des expériences de dichroïsme circulaire (DC) réalisées sur cette bactériocine ont montré également qu'elle adoptait une structure hélicoïdale à pH 5 et pH 7 avec ou sans la présence de micelles de SDS (utilisées pour mimer la bicouche lipidique des membranes des bactéries). De plus, l'analyse bio-informatique des spectres de DC avec le logiciel Betsel semble indiquer que le pH acide favorisait le repliement de la bactériocine se traduisant par une augmentation de la proportion d'hélice- $\alpha$ . Par ailleurs, la prédiction de la structure tridimensionnelle de lacticaséicine 30 a montré un repliement du peptide indiquant des interactions entre ces cinq hélices.

Pour mieux comprendre l'importance de ces interactions, nous avons décidé dans un premier temps de générer des formes tronquées de la lacticaséicine 30 (N-ter-lacticaséicine 30, C-ter-lacticaséicine 030 et N-ter-H1-lacticaséicine 30) dans le but d'identifier les régions impliquées dans l'activité antimicrobienne. Ainsi, le peptide C-ter-lacticaséicine 030, comprenant les 3 dernières hélices de la lacticaséicine 30, perd en activité en comparaison à la forme non tronquée. En effet, dans ce cas de figure la sensibilité antibactérienne est diminuée de 4 fois contre *Escherichia coli* ATCC 8739, de 2 fois contre *Salmonella enterica* serovar Newport ATCC 6962, *Proteus vulgaris* ATCC 33420 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Néanmoins, l'activité contre *Listeria innocua* CIP 80.11, utilisée comme souche cible à Gram positif, reste inchangée. Ces résultats mettent en évidence le rôle clé de la région centrale et C-terminale, dont la modification a eu pour effet de réduire l'activité antibactérienne. Ce résultat est cohérent avec ceux décrits dans diverses études soulignant le rôle de la partie C-terminale des bactériocines. Par exemple, Johnsen et al. (2005) ont démontré le rôle crucial de la région C-terminale des bactériocines de type pédiocine (bactériocine de classe IIa) dans la détermination de leur spectre antibactérien. Les mêmes résultats ont été observés pour la divercine VR41 (classe IIa) (Rihakova et al., 2009). Contrairement aux bactériocines citées ci-

dessus, la lacticaséicine 30 est active contre les bactéries Gram-négatives. Etant donné que l'activité antibactérienne du peptide N-ter-lacticaséicine 30, comprenant les 2 premières hélices de la lacticaséicine 30, est similaire à la forme non tronquée, nous avons décidé de le réduire à une seule hélice ce qui a donné lieu au peptide N-ter-H1-lacticaséicine 30. Il a été constaté que ce peptide perd totalement son activité anti Gram-négative suggérant ainsi que les deux hélices  $\alpha$  de la partie N-terminale sont nécessaires pour agir contre les bactéries à Gram-négatif.

D'autre part, des substitutions d'acides aminés ont été effectuées par mutagenèse dirigée, dans la séquence primaire de la lacticaséicine 30, dans le but de comprendre leur rôle sur l'activité anti-Gram-négative. Deux types de mutations clés ont donc été créés. La première consistant à remplacer l'acide glutamique, l'acide aspartique ou la tyrosine par la glycine ou la sérine, la seconde consistant à remplacer la thréonine ou l'alanine par la proline. Ces mutations ont été créées au sein des hélices. Puis, ces variantes désignées E6G, T7P, D57G, A74P, Y78S, Y93S, A97P, E32G, T33P et T52P ont été testées pour leurs activités anti-Gram-négatif. Une perte globale de l'activité antibactérienne est observée, à l'exception du E32G, T33P et T52P dont l'activité reste inchangée.

La substitution des acides aminés T7, T52, A74 et A97 par des prolines diminue l'activité anti Gram-négative des peptides correspondants, indiquant que le mécanisme impliqué dans l'activité Gram-négative de la lacticaséicine 30 est perturbé. De même, la substitution des acides aminés E6, D57, Y78 et Y93, a montré également une diminution de l'activité anti-Gram-négative suggérant les rôles de l'acide glutamique 6, la tyrosine 78 et la tyrosine 93 dans l'activité contre les bactéries à Gram-négatif.

Récemment, Belguesmia et al. (2020) ont montré que le surnageant de culture ainsi que la fraction semi-purifiée E20 de la souche *L. paracasei* CNCM I-5369 étaient également actifs contre les souches *E. coli* 184 et *E. coli* 289 présentant une résistance à la colistine, un antibiotique de dernier recours utilisé pour traiter les infections causées par les bactéries à Gram-négatif multirésistantes. La résistance à la colistine est due à la présence d'un gène *mcr* (résistance à la colistine mobilisé) qui a été rapporté pour la première fois par Liu et al. (2016). A ce jour, 10 gènes *mcr* ont pu être identifiés (Rebelo et al., 2018; Borowiak et al., 2020; Lei et al., 2020). L'identification accrue des souches présentant un gène *mcr* a eu pour conséquences de limiter l'usage de la colistine en tant que antibiotique de dernier recours pour les traitements des infections associées à des bacilles à Gram-négatif multirésistants (Teo et al., 2016).

L'activité de la lacticaséicine 30 contre des bactéries à Gram-négatif multirésistantes incluant la résistance à la colistine, a été évaluée dans le cadre de ce travail. Dans ce sens, 11 souches cliniques ont été testées du fait de leur caractère multirésistant mais aussi du fait de leur résistance à la colistine. L'identification du gène *mcr* par amplification et séquençage géniques a permis de révéler que toutes les souches possèdent le gène *mcr-1*, excepté les souches *E. cloacae* H51, *E. coli* 52 et *K. variicola* H7. Les souches *E. cloacae* H51 et *K. variicola* H77 possèdent le gène *mcr-9*, tandis que le mécanisme de résistance à la colistine de la souche *E. coli* 52 reste à être identifié. La résistance à la colistine via le produit du gène *mcr-1* (MCR-1) a été observée et décrite chez plusieurs bactéries à Gram-négatif. Le mécanisme est attribué à une phosphatidyléthanolamine transférase qui transfère un résidu de phosphoéthanolamine au lipide A du LPS présent dans la membrane externe des bactéries à Gram-négatif. (Gao et al., 2016; Liu et al., 2016; Li et al., 2020; Suardíaz et al., 2021). Malgré les différences entre les protéines MCR-9 et MCR-1, qui ne partagent que 36% d'identité de séquences, celles-ci confèrent une résistance à la colistine de la même manière (Kieffer et al., 2019).

A la suite de cela, l'étude des interactions synergiques de la lacticaséicine 30 et de la colistine sur les 11 souches cliniques a été réalisée par la méthode dite de « l'échiquier ». Un effet synergique de la combinaison lacticaséicine 30-colistine a été observé uniquement sur les souches *E. coli* H45, *E. coli* H52, *E. coli* H66, *K. variicola* H77 and *S. enterica* H97. La lacticaséicine 30 entraîne une diminution de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la colistine jusqu'à atteindre une concentration inférieure ou égale à la concentration critique (2 µg/ml) augmentant ainsi la sensibilité des souches citées ci-dessus (Landman et al., 2008). Par ailleurs, l'expression du gène *mcr* des souches pour lesquelles un effet de synergie a été observé, a été analysée par qPCR, en présence de colistine, de lacticaséicine 30 et de la combinaison lacticaséicine 30-colistine à des concentrations subinhibitrices (CMI/2). Dans cette étude, nous avons observé que l'utilisation de la colistine à des concentrations subinhibitrices induisait l'expression du gène *mcr*, aboutissant à une augmentation de la CMI, comme cela a été rapporté auparavant pour *E. coli* TOP10-(pNK1-mcr-9) (Kieffer et al., 2019). En revanche, lorsque la lacticaséicine 30 seule a été utilisée à des concentrations subinhibitrices, une diminution du niveau d'expression du gène *mcr* a été observée. Cette diminution était au minimum deux fois plus importante lorsque la bactériocine était combinée avec la colistine.



## **Conclusion et perspectives**

Conclusion and prospects

Les bactériocines produites par les BLs constituent une véritable alternative dans la lutte contre l'antibiorésistance. En effet, et par rapport aux antibiotiques, il est plus rare que les bactéries développent ou acquièrent des résistances aux bactériocines. Qui plus est, les bactériocines de part leurs activités, ciblant spécifiquement certains germes, sont moins néfastes pour l'équilibre des microbiotes. En outre, ces peptides peuvent également être utilisés en tant qu'agent de biopréservation pour les aliments. En effet, nombre d'entre eux, plus particulièrement ceux produits par les souches appartenant aux genres *Lactococcus* et *Lactobacillus* bénéficient du statut de GRAS (Faustman et al., 2021). A noter que à l'échelle industrielle, il serait plus facile de produire des bactériocines que des antibiotiques, car les techniques de productions sont nombreuses, variées et peu coûteuses (Mesa-Pereira et al., 2018).

Les mécanismes d'action des bactériocines produites par les BLs contre les cibles bactériennes à Gram-positif sont connus et décrits dans la littérature (Pérez-Ramos et al., 2021). Certaines d'entre elles déstabilisent la membrane cytoplasmique en formant des pores, tandis que d'autres inhibent la biosynthèse de la paroi ou dégradent celle-ci. Ces dernières années, de nouvelles bactériocines produites par les BLs ont montré une activité contre des bactéries à Gram-négatif (Todorov and Dicks, 2005; Stern et al., 2006; Line et al., 2008; Messaoudi et al., 2012). Il faut toutefois indiquer que leurs modes d'action restent à étudier. Etant donné le besoin en antibiotiques pour traiter les infections causées par les bacilles à Gram-négatif, qui sont classés d'ailleurs comme germes de priorité 1, par l'OMS et pour lesquels la recherche de nouvelle molécule antibiotique est urgente. Les bactériocines produites par les bactéries lactiques et actives contre les bacilles à Gram-négatif offrent un champ d'investigation académique et un espoir d'application. Les bactériocines produites par les BLs ne sont pas cytotoxiques et peuvent être synthétisées par des systèmes hétérologues ou via les approches de biologie de synthèse, ou par une approche chimique afin d'augmenter les rendements. Jusqu'à présent les rendements de production des bactériocines pures, à partir de cultures de bactéries dites « bactériocinogènes » pouvaient constituer un frein pour un investissement industriel.

La souche de *L. paracasei* CNCM I-5369 isolé d'un produit laitier local en Algérie a la particularité d'être active contre des bacilles à Gram-négatif, mais cette activité est pH-dépendante. L'analyse *in silico* du génome de cette souche avec le logiciel Bagel-3 a permis de localiser cinq gènes nommés *orf010*, *orf012*, *orf023*, *orf030* et *orf038*, codant donc ces bactériocines. Néanmoins, aucun gène d'immunité et de transport n'a pu être mis en évidence par cette approche de bio-informatique.

Nous avons constaté que l'expression en système natif de ces cinq gènes était corrélée avec l'activité antibactérienne de la souche, suggérant ainsi un lien possible entre l'expression des gènes et la production de ces bactériocines. De plus, la caractérisation *in silico* des gènes de bactériocines couplée aux résultats de qPCR ont révélé la co-expression des gènes *orf010* et *orf012* indiquant donc que le produit de ces deux gènes (ORF010 et ORF012) fonctionnerait comme une bactériocine à deux peptides. Par ailleurs, les cinq bactériocines (ORF010, ORF012, ORF023, ORF030, et ORF038) ont été exprimées en système hétérologue en utilisant *E. coli* Rosetta comme système hôte. Après avoir été produites, purifiées et caractérisées par spectrométrie de masse MALDI TOF, l'activité anti-Gram-négative de ces bactériocines recombinantes (à pH 5) a été démontrée en utilisant comme souche cible *E. coli* ATCC 8739. De même, une activité synergique a été observée lorsque ces cinq bactériocines ont été testées de manière concomitante.

Cependant, les quantités des bactériocines ORF010, ORF012, ORF023 et ORF038 obtenues après purification demeuraient faibles, car la majorité des peptides produits se retrouvait piégée dans les corps d'inclusion. La co-expression de ces bactériocines avec une protéine chaperonne peut être considérée comme une alternative pour améliorer leur repliement au sein de l'hôte *E. coli* (Zhou et al., 2018). En outre, d'autres systèmes d'expression hétérologue, tels que *Lactobacillus* (Gram-positif) et *Pichia* (levure), peuvent être envisagés afin d'augmenter le rendement de purification de ces peptides afin de pouvoir les caractériser davantage (Cui et al., 2021). De plus, dans le futur, il serait intéressant de comprendre la régulation de la biosynthèse de ces bactériocines chez *L. paracasei* CNCM I-5369, en identifiant les potentiels systèmes de transport et d'immunité utilisés par la bactérie productrice pour externaliser ces molécules, aussi pour se prémunir de leur activité.

Étant donné que la bactériocine ORF030, renommée lacticasécine 30, est plus aisément produite en système hétérologue à l'issue de nos différents essais, nous avons décidé de nous focaliser sur cette dernière pour comprendre les relations structure-activité chez ce peptide. La lacticasécine 30 a montré une structure secondaire comportant cinq hélices- $\alpha$ . Nous avons pu observer que les formes tronquées N-ter-lacticasécine 30 (comportant les deux premières hélices) et C-ter-lacticasécine 30 (comportant les 3 dernières hélices) sont actives à la fois contre les bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif. Bien que la région N-terminale semble plus être impliquée dans l'activité anti-Gram-négative, la première hélice seule ne suffit pas pour l'activité anti-Gram-négative. Par ailleurs, différents variants de la lacticasécine 30, contenant une mutation ponctuelle ont été obtenus par mutagénèse dirigée, et ont permis de

mettre en évidence l'importance de certains acides aminés jouant un rôle clé dans la structure la lacticaséicine 30 (Glu 6, Tyr 78 et Tyr 93) et par conséquent dans son activité contre les bactéries Gram-négatives. La réalisation d'autres mutations (par mutagénèse dirigée ou aléatoire) peut être envisagée dans le but d'augmenter l'activité antibactérienne.

L'activité de la lacticaséicine 30 combinée à la colistine a été testée sur plusieurs souches de bactéries à Gram-négatif multirésistantes, y compris à la colistine. Un effet synergique de la combinaison lacticaséicine 30-colistine a été observé sur certaines de ces souches permettant l'obtention d'un phénotype de sensibilité à la colistine. En outre, la combinaison lacticaséicine 30-colistine diminuait drastiquement le niveau d'expression du gène *mcr* (gène responsable de la résistance à la colistine) chez les souches chez lesquelles un effet synergique de cette combinaison a été observé.

A moyen terme, il serait intéressant d'identifier les cibles cellulaires potentielles (paroi, membranes...) de la lacticaséicine 30 afin d'en élucider le mode d'action. A noter que des travaux récents à partir de la fraction E20 semblent suggérer que cette bactériocine ne ciblait pas les LPS. Cependant, cette hypothèse reste à être confirmée. Comme cela a été observée pour d'autres bactériocines, il serait intéressant de rechercher d'autres activités, telles que des activités antivirales et anticancérigènes (Dridier et al., 2016).

Au cours de cette thèse, nous avons pu constater que l'activité de la lacticaséicine 30, ainsi que celle des autres bactériocines produites par la souche *L. paracasei* CNCM I-5369, sont pH-dépendantes, ce qui pourrait limiter leur utilisation en tant qu'agent de biopréservation ou comme outil thérapeutique. Par conséquent, il pourrait être envisagé à plus long terme d'explorer les alternatives permettant d'abolir cette dépendance du pH soit par de l'ingénierie moléculaire, soit en recourant à des formulations, l'associant avec d'autres types de molécules, afin d'en élargir le spectre des utilisations possibles.

## **Références bibliographiques**

Bibliography references

- Aberg, V., and Almqvist, F. (2007). Pilicides-small molecules targeting bacterial virulence. *Org Biomol Chem* 5, 1827–1834. doi:10.1039/b702397a.
- Acedo, J. Z., Chiorean, S., Vederas, J. C., and van Belkum, M. J. (2018). The expanding structural variety among bacteriocins from Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 42, 805–828. doi:10.1093/femsre/fuy033.
- Acedo, J. Z., Towle, K. M., Lohans, C. T., Miskolzie, M., McKay, R. T., Doerksen, T. A., et al. (2017). Identification and three-dimensional structure of carnobacteriocin XY, a class IIb bacteriocin produced by *Carnobacteria*. *FEBS Lett* 591, 1349–1359. doi:10.1002/1873-3468.12648.
- Al Atya, A. K., Abriouel, H., Kempf, I., Jouy, E., Auclair, E., Vachée, A., et al. (2016). Effects of colistin and bacteriocins combinations on the in vitro growth of *Escherichia coli* strains from swine origin. *Probiotics & Antimicro. Prot.* 8, 183–190. doi:10.1007/s12602-016-9227-9.
- Alexandre, Y., Le Blay, G., Boisramé-Gastrin, S., Le Gall, F., Héry-Arnaud, G., Gouriou, S., et al. (2014). Probiotics: A new way to fight bacterial pulmonary infections? *Med Mal Infect.* 44, 9–17. doi:10.1016/j.medmal.2013.05.001.
- Al-Madboly, L. A., El-Deeb, N. M., Kabbash, A., Nael, M. A., Kenawy, A. M., and Ragab, A. E. (2020). Purification, characterization, identification, and anticancer activity of a circular bacteriocin from *Enterococcus thailandicus*. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, 450. doi:10.3389/fbioe.2020.00450.
- Alvarez, Y., Fernández, F., and Ponce-Alquicira, E. (2017). “Characteristics of antibacterial peptides produced by bacteria Characteristics of antibacterial peptides produced by bacteria,” in, 35–45.
- Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., and Kuipers, O. P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl Microbiol Biotechnol* 100, 2939–2951. doi:10.1007/s00253-016-7343-9.
- Aminov, R., Caplin, J., Chanishvili, N., Coffey, A., Cooper, I., Vos, D. D., et al. (2017). Application of bacteriophages. *Microbiol. Aust.* 38, 63–66. doi:10.1071/MA17029.
- Arnison, P. G., Bibb, M. J., Bierbaum, G., Bowers, A. A., Bugni, T. S., Bulaj, G., et al. (2013). Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Nat Prod Rep* 30, 108–160. doi:10.1039/c2np20085f.
- Baindara, P., Korpole, S., and Grover, V. (2018). Bacteriocins: perspective for the development of novel anticancer drugs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 10393–10408. doi:10.1007/s00253-018-9420-8.
- Baquero, F., Lanza, V. F., Baquero, M.-R., Del Campo, R., and Bravo-Vázquez, D. A. (2019). Microcins in *Enterobacteriaceae*: peptide antimicrobials in the eco-active intestinal chemosphere. *Front Microbiol* 10, 2261. doi:10.3389/fmicb.2019.02261.
- Barrett, A. J., and Rawlings, N. D. (1996). Families and clans of cysteine peptidases. *Perspect Drug Discov Des* 6, 1–11. doi:10.1007/BF02174042.

- Bastos, M. do C. de F., Coutinho, B. G., and Coelho, M. L. V. (2010). Lysostaphin: A *Staphylococcal* bacteriolysin with potential clinical applications. *Pharmaceuticals (Basel)* 3, 1139–1161. doi:10.3390/ph3041139.
- Beaulieu, L. (2005). Production, purification et caractérisation de la pediocine PA-1 naturelle et de ses formes recombinantes: Contribution a la mise en évidence d'une nouvelle activité biologique (French and English text). Available at: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=9065648> [Accessed September 11, 2021].
- Bédard, F., Hammami, R., Zirah, S., Rebuffat, S., Fliss, I., and Biron, E. (2018). Synthesis, antimicrobial activity and conformational analysis of the class IIa bacteriocin pediocin PA-1 and analogs thereof. *Sci Rep* 8, 9029. doi:10.1038/s41598-018-27225-3.
- Belguesmia, Y., Bendjeddou, K., Kempf, I., Boukherroub, R., and Drider, D. (2020a). Heterologous biosynthesis of five new class II bacteriocins from *Lactobacillus paracasei* CNCM I-5369 with antagonistic activity against pathogenic *Escherichia coli* strains. *Front. Microbiol.* 11. doi:10.3389/fmicb.2020.01198.
- Belguesmia, Y., Hazime, N., Kempf, I., Boukherroub, R., and Drider, D. (2020b). New bacteriocins from *Lactocaseibacillus paracasei* CNCM I-5369 adsorbed on alginate nanoparticles are very active against *Escherichia coli*. *Int J Mol Sci* 21. doi:10.3390/ijms21228654.
- Belguesmia, Y., Madi, A., Sperandio, D., Merieau, A., Feuilloley, M., Prévost, H., et al. (2011). Growing insights into the safety of bacteriocins: the case of enterocin S37. *Res Microbiol* 162, 159–163. doi:10.1016/j.resmic.2010.09.019.
- Ben Lagha, A., Haas, B., Gottschalk, M., and Grenier, D. (2017). Antimicrobial potential of bacteriocins in poultry and swine production. *Vet. Res.* 48, 22. doi:10.1186/s13567-017-0425-6.
- Bierbaum, G., and Sahl, H.-G. (2009). Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Curr Pharm Biotechnol* 10, 2–18. doi:10.2174/138920109787048616.
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., and Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 13, 42–51. doi:10.1038/nrmicro3380.
- Borowiak, M., Baumann, B., Fischer, J., Thomas, K., Deneke, C., Hammerl, J. A., et al. (2020). Development of a novel mcr-6 to mcr-9 multiplex PCR and assessment of mcr-1 to mcr-9 occurrence in colistin-resistant salmonella enterica isolates from environment, feed, animals and food (2011–2018) in Germany. *Frontiers in Microbiology* 11, 80. doi:10.3389/fmicb.2020.00080.
- Bouveret, E., Journet, L., Walburger, A., Cascales, E., Bénédicti, H., and Llobès, R. (2002). Analysis of the *Escherichia coli* Tol–Pal and TonB systems by periplasmic production of Tol, TonB, colicin, or phage capsid soluble domains. *Biochimie* 84, 413–421. doi:10.1016/S0300-9084(02)01423-2.
- 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. doi:10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00193.x.
- Cascales, E., Buchanan, S. K., Duché, D., Kleanthous, C., Llobès, R., Postle, K., et al. (2007). Colicin biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 158–229. doi:10.1128/MMBR.00036-06.

- Cebrián, R., Maqueda, M., Neira, J. L., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., and Montalbán-López, M. (2010). Insights into the functionality of the putative residues involved in enterocin AS-48 maturation. *Appl Environ Microbiol* 76, 7268–7276. doi:10.1128/AEM.01154-10.
- Cebrián, R., Rodríguez-Cabezas, M. E., Martín-Escolano, R., Rubiño, S., Garrido-Barros, M., Montalbán-López, M., et al. (2019). Preclinical studies of toxicity and safety of the AS-48 bacteriocin. *J. Adv. Res.* 20, 129–139. doi:10.1016/j.jare.2019.06.003.
- Cegelski, L., Marshall, G. R., Eldridge, G. R., and Hultgren, S. J. (2008). The biology and future prospects of antivirulence therapies. *Nat Rev Microbiol* 6, 17–27. doi:10.1038/nrmicro1818.
- Chan, B. K., Abedon, S. T., and Loc-Carrillo, C. (2013). Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiol* 8, 769–783. doi:10.2217/fmb.13.47.
- Chanos, P., and Mygind, T. (2016). Co-culture-inducible bacteriocin production in lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 100, 4297–4308. doi:10.1007/s00253-016-7486-8.
- Chatterjee, C., Paul, M., Xie, L., and van der Donk, W. A. (2005). Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chem Rev* 105, 633–684. doi:10.1021/cr030105v.
- Cheigh, C.-I., and Pyun, Y.-R. (2005). Nisin biosynthesis and its properties. *Biotechnol Lett* 27, 1641–1648. doi:10.1007/s10529-005-2721-x.
- Chikindas, M. L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V. A., and Dicks, L. M. T. (2018). Functions and emerging applications of bacteriocins. *Curr Opin Biotechnol* 49, 23–28. doi:10.1016/j.copbio.2017.07.011.
- Cintas, L. M., Casaus, P., Håvarstein, L. S., Hernández, 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. doi:10.1128/aem.63.11.4321-4330.1997.
- 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. doi:10.1128/JB.180.8.1988-1994.1998.
- Clark, S., Jowitt, T. A., Harris, L. K., Knight, C. G., and Dobson, C. B. (2021). The lexicon of antimicrobial peptides: a complete set of arginine and tryptophan sequences. *Commun Biol* 4, 1–14. doi:10.1038/s42003-021-02137-7.
- Coquant, G., Grill, J.-P., and Seksik, P. (2020). Impact of N-Acyl-homoserine lactones, quorum sensing molecules, on gut immunity. *Front. Immunol.* 11, 1827. doi:10.3389/fimmu.2020.01827.
- Cotter, P. D., Hill, C., and Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol* 3, 777–788. doi:10.1038/nrmicro1273.
- Craik, D. J. (2004). Circular peptides and proteins - preface. *Curr. Protein Pept. Sci.* 5. Available at: <https://espace.library.uq.edu.au/view/UQ:41723> [Accessed June 14, 2021].
- Cui, Y., Luo, L., Wang, X., Lu, Y., Yi, Y., Shan, Y., et al. (2021). Mining, heterologous expression, purification, antibactericidal mechanism, and application of bacteriocins: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 20, 863–899. doi:10.1111/1541-4337.12658.



- Daly, K. M., Cotter, P. D., Hill, C., and Ross, R. P. (2012). Lantibiotic production by pathogenic microorganisms. *Curr Protein Pept Sci* 13, 509–523. doi:10.2174/138920312803582997.
- De Kwaadsteniet, M., Fraser, T., Van Reenen, C. A., and Dicks, L. M. T. (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. doi:10.1128/AEM.00436-06.
- Dicks, L. M. T., Dreyer, L., Smith, C., and van Staden, A. D. (2018). A review: the fate of bacteriocins in the human gastro-intestinal tract: do they cross the gut–blood barrier? *Front. Microbiol.* 9. doi:10.3389/fmicb.2018.02297.
- Dong, Y. H., Wang, L. H., Xu, J. L., Zhang, H. B., Zhang, X. F., and Zhang, L. H. (2001). Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature* 411, 813–817. doi:10.1038/35081101.
- Drider, D., Bendali, F., Naghmouchi, K., and Chikindas, M. L. (2016). Bacteriocins: not only antibacterial agents. *Probiotics & Antimicro. Prot.* 8, 177–182. doi:10.1007/s12602-016-9223-0.
- 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. doi:10.1128/MMBR.00016-05.
- Drider, D., and Rebuffat, S. (2011). *Prokaryotic antimicrobial peptides: From genes to applications*. Springer Science & Business Media.
- Dublanchet, A., and Bourne, S. (2007). The epic of phage therapy. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 18, 15–18. doi:10.1155/2007/365761.
- Duquesne, S., Destoumieux-Garzón, D., Peduzzi, J., and Rebuffat, S. (2007a). Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Nat. Prod. Rep.* 24, 708–734. doi:10.1039/B516237H.
- Duquesne, S., Petit, V., Peduzzi, J., and Rebuffat, S. (2007b). Structural and functional diversity of microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* 13, 200–209. doi:10.1159/000104748.
- Ekblad, B., and Kristiansen, P. E. (2019). NMR structures and mutational analysis of the two peptides constituting the bacteriocin plantaricin S. *Sci Rep* 9, 2333. doi:10.1038/s41598-019-38518-6.
- Epand, R. M., and Vogel, H. J. (1999). harr. *Biochim Biophys Acta* 1462, 11–28. doi:10.1016/s0005-2736(99)00198-4.
- Fahnert, B., Lilie, H., and Neubauer, P. (2004). “Inclusion Bodies: Formation and Utilisation,” in *Physiological Stress Responses in Bioprocesses: -/- Advances in Biochemical Engineering*. (Berlin, Heidelberg: Springer), 93–142. doi:10.1007/b93995.
- Faustman, C., Aaron, D., Negowetti, N., and Leib, E. B. (2021). Ten years post-GAO assessment, FDA remains uninformed of potentially harmful GRAS substances in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 61, 1260–1268. doi:10.1080/10408398.2020.1756217.
- Ferry, T., Kolenda, C., Batailler, C., Gustave, C.-A., Lustig, S., Malatray, M., et al. (2020). Phage therapy as adjuvant to conservative surgery and antibiotics to salvage patients with relapsing *S. aureus* prosthetic knee infection. *Front. Med.* 7, 721. doi:10.3389/fmed.2020.570572.

- 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 Proteins Proteom BBA-PROTEINS PROTEOM* 1784, 1711–1719. doi:10.1016/j.bbapap.2008.05.003.
- Firon, N., Ashkenazi, S., Mirelman, D., Ofek, I., and Sharon, N. (1987). Aromatic alpha-glycosides of mannose are powerful inhibitors of the adherence of type 1 fimbriated *Escherichia coli* to yeast and intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 55, 472–476. doi:10.1128/iai.55.2.472-476.1987.
- Frieri, M., Kumar, K., and Boutin, A. (2017). Antibiotic resistance. *J. Infect. Public Health* 10, 369–378. doi:10.1016/j.jiph.2016.08.007.
- Gabrielsen, C., Brede, D. A., Nes, I. F., and Diep, D. B. (2014). Circular bacteriocins: biosynthesis and mode of action. *Appl Environ Microbiol* 80, 6854–6862. doi:10.1128/AEM.02284-14.
- Gao, R., Hu, Y., Li, Z., Sun, J., Wang, Q., Lin, J., et al. (2016). Dissemination and mechanism for the MCR-1 colistin resistance. *PLoS Pathog.* 12, e1005957. doi:10.1371/journal.ppat.1005957.
- Gomez-Escribano, J. P., Song, L., Bibb, M. J., and Challis, G. L. (2012). Posttranslational  $\beta$ -methylation and macrolactamidation in the biosynthesis of the bottromycin complex of ribosomal peptide antibiotics. *Chem. Sci.* 3, 3522–3525. doi:10.1039/C2SC21183A.
- Gordon, D. M., Oliver, E., and Littlefield-Wyer, J. (2007). “The diversity of bacteriocins in Gram-Negative bacteria,” in *Bacteriocins: Ecology and Evolution*, eds. M. A. Riley and M. A. Chavan (Berlin, Heidelberg: Springer), 5–18. doi:10.1007/978-3-540-36604-1\_2.
- Grande Burgos, M. J., Pulido, R. P., Del Carmen López Aguayo, M., Gálvez, A., and Lucas, R. (2014). The cyclic antibacterial peptide enterocin AS-48: isolation, mode of action, and possible food applications. *Int J Mol Sci* 15, 22706–22727. doi:10.3390/ijms151222706.
- Guidos, R., J. (2011). Combating antimicrobial resistance: policy recommendations to save lives. *Clin Infect Dis* 52, S397–S428. doi:10.1093/cid/cir153.
- Gutiérrez, J., Criado, R., Citti, R., Martín, M., Herranz, C., Nes, I. F., et al. (2005). Cloning, production and functional expression of enterocin P, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* P13, in *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology* 103, 239–250. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.035.
- Harris, F., Dennison, S. R., and Phoenix, D. A. (2009). Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. *Curr Protein Pept Sci* 10, 585–606. doi:10.2174/138920309789630589.
- Hauge, H. H., Mantzilas, D., Eijsink, V. G. H., 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.
- Hauge, H. H., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., and Eijsink, V. G. (1998). 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. doi:10.1046/j.1432-1327.1998.2510565.x.
- Helander, I. M., von Wright, A., and Mattila-Sandholm, T.-M. (1997). Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends Food Sci. Technol.* 8, 146–150. doi:10.1016/S0924-2244(97)01030-3.

- Heng, N. C. K., and Tagg, J. R. (2006). What's in a name? Class distinction for bacteriocins. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 160–160. doi:10.1038/nrmicro1273-c1.
- Houlihan, A. J., Mantovani, H. C., and Russell, J. B. (2004). Effect of pH on the activity of bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5. *FEMS Microbiol Lett* 231, 27–32. doi:10.1016/S0378-1097(03)00922-4.
- Hultgren, S. J., Lindberg, F., Magnusson, G., Kihlberg, J., Tennent, J. M., and Normark, S. (1989). The PapG adhesin of uropathogenic *Escherichia coli* contains separate regions for receptor binding and for the incorporation into the pilus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 4357–4361.
- Hung, D. L., and Hultgren, S. J. (1998). Pilus biogenesis via the chaperone/usher pathway: an integration of structure and function. *J Struct Biol* 124, 201–220. doi:10.1006/jsbi.1998.4049.
- Hung, D. T., Shakhnovich, E. A., Pierson, E., and Mekalanos, J. J. (2005). Small-molecule inhibitor of *Vibrio cholerae* virulence and intestinal colonization. *Science* 310, 670–674. doi:10.1126/science.1116739.
- Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., and Rozès, N. (2011). Expression of *Lactobacillus pentosus* B96 bacteriocin genes under saline stress. *Food Microbiol* 28, 1339–1344. doi:10.1016/j.fm.2011.06.004.
- Ingham, A. B., Sproat, K. W., Tizard, M. L. V., and Moore, R. J. (2005). A versatile system for the expression of nonmodified bacteriocins in *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol* 98, 676–683. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02502.x.
- Jim O'Neill (2016). *Nature Reviews Drug Discovery* 15, 526–526. doi:10.1038/nrd.2016.160.
- Johnsen, L., Fimland, G., and Nissen-Meyer, J. (2005). 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. doi:10.1074/jbc.M412712200.
- Kapoor, G., Saigal, S., and Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: a guide for clinicians. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol* 33, 300–305. doi:10.4103/joacp.JOACP\_349\_15.
- Kareb, O., and Aïder, M. (2020). Quorum Sensing circuits in the communicating mechanisms of bacteria and Its implication in the biosynthesis of bacteriocins by lactic acid bacteria: a review. *Probiotics Antimicrob Proteins* 12, 5–17. doi:10.1007/s12602-019-09555-4.
- Kaur, I. P., Chopra, K., and Saini, A. (2002). Probiotics: potential pharmaceutical applications. *Eur. J. Pharm. Sci.* 15, 1–9. doi:10.1016/S0928-0987(01)00209-3.
- Kaur, S., and Kaur, S. (2015). Bacteriocins as potential anticancer agents. *Frontiers in Pharmacology* 6, 272. doi:10.3389/fphar.2015.00272.
- Kieffer, N., Royer, G., Decousser, J.-W., Bourrel, A.-S., Palmieri, M., Ortiz De La Rosa, J.-M., et al. (2019). mcr-9, an Inducible gene encoding an acquired phosphoethanolamine transferase in *Escherichia coli*, and its origin. *Antimicrob Agents Chemother* 63, e00965-19. doi:10.1128/AAC.00965-19.

- Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 12, 39–85. doi:10.1111/j.1574-6976.1993.tb00012.x.
- Kutter, E., and Sulakvelidze, A. (2004). *Bacteriophages: Biology and Applications*. CRC Press.
- Landman, D., Georgescu, C., Martin, D. A., and Quale, J. (2008). Polymyxins revisited. *Clin Microbiol Rev* 21, 449–465. doi:10.1128/CMR.00006-08.
- Le Berre, R., Faure, K., Nguyen, S., Pierre, M., Ader, F., and Guery, B. (2006). Quorum sensing : une nouvelle cible thérapeutique pour *Pseudomonas aeruginosa*. *Med Mal Infect.* 36, 349–357. doi:10.1016/j.medmal.2006.01.008.
- Lehrbach, P. R., and Broda, P. (1984). Molecular comparisons of plasmids isolated from colicinogenic strains of *Escherichia coli*. *Microbiology* 130, 401–410. doi:10.1099/00221287-130-2-401.
- Lei, C.-W., Zhang, Y., Wang, Y.-T., and Wang, H.-N. (2020). Detection of mobile colistin resistance Gene *mcr-10.1* in a conjugative plasmid from *Enterobacter roggenkampii* of chicken origin in China. *Antimicrob Agents Chemother* 64, e01191-20. doi:10.1128/AAC.01191-20.
- Li, J., Beuerman, R., and Verma, C. S. (2020). Dissecting the Molecular Mechanism of Colistin Resistance in *mcr-1* Bacteria. *J. Chem. Inf. Model.* 60, 4975–4984. doi:10.1021/acs.jcim.0c01051.
- Li, Y., and Rebuffat, S. (2020). The manifold roles of microbial ribosomal peptide–based natural products in physiology and ecology. *J Biol Chem* 295, 34–54. doi:10.1074/jbc.REV119.006545.
- Line, J. E., Svetoch, E. A., Eruslanov, B. V., Perelygin, V. V., Mitsevich, E. V., Mitsevich, I. P., et al. (2008). Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 1094–1100. doi:10.1128/AAC.01569-06.
- Liu, Y.-Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L.-X., Zhang, R., Spencer, J., et al. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 16, 161–168. doi:10.1016/S1473-3099(15)00424-7.
- Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., and Björn, C. (2016). Antimicrobial peptides: An emerging category of therapeutic agents. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6, 194. doi:10.3389/fcimb.2016.00194.
- Marcoleta, A. E., Gutiérrez-Cortez, S., Hurtado, F., Argandoña, Y., Corsini, G., Monasterio, O., et al. (2018). The Ferric uptake regulator (Fur) and iron availability control the production and maturation of the antibacterial peptide microcin E492. *PLOS ONE* 13, e0200835. doi:10.1371/journal.pone.0200835.
- Marques-Bastos, S. L. S., Coelho, M. L. V., de Sousa Santos, I. N., Farias, F. M., Silva Francisco, M., Albano, R. M., et al. (2020). Draft genome sequence of the producer strain of aureocin 4181, an antimicrobial peptide with antagonistic activity against multidrug-resistant staphylococci. *J Glob Antimicrob Resist* 23, 331–333. doi:10.1016/j.jgar.2020.10.015.
- Mathavan, I., and Beis, K. (2012). The role of bacterial membrane proteins in the internalization of microcin MccJ25 and MccB17. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 1539–1543. doi:10.1042/BST20120176.

- McAuliffe, O., Ross, R. P., and Hill, C. (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 285–308. doi:10.1111/j.1574-6976.2001.tb00579.x.
- Meade, E., Slattery, M. A., and Garvey, M. (2020). Bacteriocins, potent antimicrobial peptides and the fight against multi drug resistant species: resistance is futile? *Antibiotics (Basel)* 9, 32. doi:10.3390/antibiotics9010032.
- Mendelson, M., Brink, A., Gouws, J., Mbelle, N., Naidoo, V., Pople, T., et al. (2018). The One Health stewardship of colistin as an antibiotic of last resort for human health in South Africa. *The Lancet Infect. Dis.* 18, e288–e294. doi:10.1016/S1473-3099(18)30119-1.
- Mesa-Pereira, B., Rea, M. C., Cotter, P. D., Hill, C., and Ross, R. P. (2018). Heterologous expression of biopreservative bacteriocins with a view to low cost production. *Front. Microbiol.* 9. doi:10.3389/fmicb.2018.01654.
- Messaoudi, S., Kergourlay, G., Dalgalarondo, M., Choiset, Y., Ferchichi, M., Prévost, H., et al. (2012). Purification and characterization of a new bacteriocin active against *Campylobacter* produced by *Lactobacillus salivarius* SMXD51. *Food Microbiol* 32, 129–134. doi:10.1016/j.fm.2012.05.002.
- Metlitskaya, A., Kazakov, T., Kommer, A., Pavlova, O., Praetorius-Ibba, M., Ibba, M., et al. (2006). Aspartyl-tRNA synthetase is the target of peptide nucleotide antibiotic microcin C\*. *J Biol Chem* 281, 18033–18042. doi:10.1074/jbc.M513174200.
- Michel-Briand, Y., and Baysse, C. (2002). The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* 84, 499–510. doi:10.1016/S0300-9084(02)01422-0.
- Millette, M. (2007). Étude de bactéries lactiques à potentiel probiotique et de leurs métabolites. Available at: <http://espace.inrs.ca/id/eprint/253/> [Accessed August 22, 2021].
- Mohr, K. I. (2016). “History of Antibiotics Research,” in *How to Overcome the Antibiotic Crisis : Facts, Challenges, Technologies and Future Perspectives* Current Topics in Microbiology and Immunology., eds. M. Stadler and P. Dersch (Cham: Springer International Publishing), 237–272. doi:10.1007/82\_2016\_499.
- 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. doi:10.1046/j.1472-765X.2001.01016.x.
- Negash, A. W., and Tsehai, B. A. (2020). Current applications of bacteriocin. *Int. J. Microbiol.* 2020, e4374891. doi:10.1155/2020/4374891.
- Neira, J. L., Contreras, L. M., de los Paños, O. R., Sánchez-Hidalgo, M., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., et al. (2010). Structural characterisation of the natively unfolded enterocin EJ97. *Protein Eng Des Sel* 23, 507–518. doi:10.1093/protein/gzq020.
- Ng, Z. J., Zarin, M. A., Lee, C. K., and Tan, J. S. (2020). Application of bacteriocins in food preservation and infectious disease treatment for humans and livestock: a review. *RSC Adv.* 10, 38937–38964. doi:10.1039/D0RA06161A.
- Nguyen, C., and Nguyen, V. D. (2016). Discovery of Azurin-Like anticancer bacteriocins from human gut microbiome through homology modeling and molecular docking against the tumor suppressor p53. *Biomed Res. Int.* 2016, e8490482. doi:10.1155/2016/8490482.

- Nilsen, T., Nes, I. F., and Holo, H. (2003). Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl Environ Microbiol* 69, 2975–2984. doi:10.1128/AEM.69.5.2975-2984.2003.
- Nissen-Meyer, J., Opegård, C., Rogne, P., Haugen, H. S., and Kristiansen, P. E. (2010). Structure and mode-of-action of the two-peptide (Class-IIb) bacteriocins. *Probiotics & Antimicro. Prot.* 2, 52–60. doi:10.1007/s12602-009-9021-z.
- O'Connor, P. M., Kuniyoshi, T. M., Oliveira, R. P., Hill, C., Ross, R. P., and Cotter, P. D. (2020). Antimicrobials for food and feed; a bacteriocin perspective. *Curr. Opin. Biotechnol.* 61, 160–167. doi:10.1016/j.copbio.2019.12.023.
- Oelschlaeger, T. A. (2010). Mechanisms of probiotic actions – A review. *Int. J. Med. Microbiol.* 300, 57–62. doi:10.1016/j.ijmm.2009.08.005.
- Olaitan, A. O., Morand, S., and Rolain, J.-M. (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front. Microbiol.* 0. doi:10.3389/fmicb.2014.00643.
- Oman, T. J., and van der Donk, W. A. (2010). Follow the leader: the use of leader peptides to guide natural product biosynthesis. *Nat Chem Biol* 6, 9–18. doi:10.1038/nchembio.286.
- Orihuel, A., Bonacina, J., Vildoza, M. J., Bru, E., Vignolo, G., Saavedra, L., et al. (2018). Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in a meat model using a combination of a bacteriocinogenic strain with curing additives. *Food Res Int* 107, 289–296. doi:10.1016/j.foodres.2018.02.043.
- O'Toole, P. W., and Cooney, J. C. (2008). Probiotic Bacteria Influence the Composition and Function of the Intestinal Microbiota. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2008, 175285. doi:10.1155/2008/175285.
- Padmavathi, P. V. L., and Steinhoff, H.-J. (2008). Conformation of the closed channel state of colicin A in proteoliposomes: an umbrella model. *J Mol Biol* 378, 204–214. doi:10.1016/j.jmb.2008.02.038.
- Papadakos, G., Wojdyla, J. A., and Kleanthous, C. (2012). Nuclease colicins and their immunity proteins. *Q Rev Biophys* 45, 57–103. doi:10.1017/S0033583511000114.
- Papaneophytou, C. P., and Kontopidis, G. (2014). Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in *Escherichia coli*: a general review. *Protein Expr Purif* 94, 22–32. doi:10.1016/j.pep.2013.10.016.
- Pearson, W. R. (2013). An Introduction to sequence similarity (“Homology”) searching. *Curr Protoc Bioinformatics* 0 3, 10.1002/0471250953.bi0301s42. doi:10.1002/0471250953.bi0301s42.
- Peraro, M. D., and van der Goot, F. G. (2016). Pore-forming toxins: ancient, but never really out of fashion. *Nat Rev Microbiol* 14, 77–92. doi:10.1038/nrmicro.2015.3.
- Perez, R. H., Zendo, T., and Sonomoto, K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microb Cell Fact* 13 Suppl 1, S3. doi:10.1186/1475-2859-13-S1-S3.
- Pérez-Ramos, A., Madi-Moussa, D., Coucheney, F., and Drider, D. (2021). Current knowledge of the mode of action and immunity mechanisms of LAB-bacteriocins. *Microorganisms* 9, 2107. doi:10.3390/microorganisms9102107.

- Prescott, L. M., Willey, J. M., Sherwood, L. M., and Woolverton, C. J. (2018). *Microbiologie*. De Boeck Supérieur.
- Rasko, D. A., and Sperandio, V. (2010). Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nat Rev Drug Discov* 9, 117–128. doi:10.1038/nrd3013.
- Ravat, F., Jault, P., and Gabard, J. (2015). Bactériophages et phagothérapie: utilisation de virus naturels pour traiter les infections bactériennes. *Ann Burns Fire Disasters* 28, 13–20.
- Rea, M. C., Ross, R. P., Cotter, P. D., and Hill, C. (2011). “Classification of bacteriocins from Gram-positive bacteria,” in *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*, eds. D. Drider and S. Rebuffat (New York, NY: Springer), 29–53. doi:10.1007/978-1-4419-7692-5\_3.
- Rebelo, A. R., Bortolaia, V., Kjeldgaard, J. S., Pedersen, S. K., Leekitcharoenphon, P., Hansen, I. M., et al. (2018). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes. *Euro Surveill* 23, 17–00672. doi:10.2807/1560-7917.ES.2018.23.6.17-00672.
- Rebuffat, S. (2012). Microcins in action: amazing defence strategies of Enterobacteria. *Biochem Soc Trans* 40, 1456–1462. doi:10.1042/BST20120183.
- Renye, J. A., Somkuti, G. A., Garabal, J. I., and Steinberg, D. H. (2016). Bacteriocin production by *Streptococcus thermophilus* in complex growth media. *Biotechnol. Lett.* 38, 1947–1954. doi:10.1007/s10529-016-2184-2.
- Rezaei Javan, R., van Tonder, A. J., King, J. P., Harrold, C. L., and Brueggemann, A. B. (2018). Genome sequencing reveals a large and diverse repertoire of antimicrobial peptides. *Front Microbiol* 9, 2012. doi:10.3389/fmicb.2018.02012.
- 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. doi:10.1128/JB.186.13.4276-4284.2004.
- Rihakova, J., Petit, V. W., Demnerova, K., Prévost, H., Rebuffat, S., and Drider, D. (2009). Insights into structure-activity relationships in the C-terminal region of divercin V41, a class IIa bacteriocin with high-level antilisterial activity. *Appl Environ Microbiol* 75, 1811–1819. doi:10.1128/AEM.02266-08.
- Riley, M. A., and Wertz, J. E. (2002). Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie* 84, 357–364. doi:10.1016/S0300-9084(02)01421-9.
- 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 Proteins Proteom BBA-PROTEINS PROTEOM* 1784, 543–554. doi:10.1016/j.bbapap.2007.12.002.
- 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. doi:10.1016/j.peptides.2009.06.010.
- Rohwer, F. (2003). Global phage diversity. *Cell* 113, 141. doi:10.1016/S0092-8674(03)00276-9.

- 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. doi:10.1111/j.1432-1033.1995.tb20627.x.
- Salazar, F., Ortiz, A., and Sansinenea, E. (2017). Characterisation of two novel bacteriocin-like substances produced by *Bacillus amyloliquefaciens* ELI149 with broad-spectrum antimicrobial activity. *J Glob Antimicrob Resist* 11, 177–182. doi:10.1016/j.jgar.2017.08.008.
- Sanseverino, I., Loos, R., Navarro Cuenca, A., Marinov, D., and Lettieri, T. (2018). *State of the art on the contribution of water to antimicrobial resistance*. LU: Publications Office of the European Union Available at: <https://data.europa.eu/doi/10.2760/771124> [Accessed July 28, 2021].
- Sauer, M. M., Jakob, R. P., Eras, J., Baday, S., Eriş, D., Navarra, G., et al. (2016). Catch-bond mechanism of the bacterial adhesin FimH. *Nat Commun* 7, 10738. doi:10.1038/ncomms10738.
- Schneider, T., Hahn-Löbmann, S., Stephan, A., Schulz, S., Giritch, A., Naumann, M., et al. (2018). Plant-made *Salmonella* bacteriocins salmocins for control of *Salmonella* pathovars. *Sci Rep* 8, 4078. doi:10.1038/s41598-018-22465-9.
- Schofs, L., Sparo, M. D., and Sánchez Bruni, S. F. (2020). Gram-positive bacteriocins: usage as antimicrobial agents in veterinary medicine. *Vet Res Commun* 44, 89–100. doi:10.1007/s11259-020-09776-x.
- 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. doi:10.1016/j.sbi.2004.07.007.
- Shang, L., Yu, H., Liu, H., Chen, M., Zeng, X., and Qiao, S. (2021). Recombinant antimicrobial peptide microcin J25 alleviates DSS-induced colitis via regulating intestinal barrier function and modifying gut microbiota. *Biomed. Pharmacother* 139, 111127. doi:10.1016/j.biopha.2020.111127.
- Shi, Y., Bueno, A., and Donk, W. A. van der (2012). Heterologous production of the lantibiotic Ala(0)actagardine in *Escherichia coli*. *Chem. Commun.* 48, 10966–10968. doi:10.1039/C2CC36336D.
- Silva, C. C. G., Silva, S. P. M., and Ribeiro, S. C. (2018). Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. *Front Microbiol* 9, 594. doi:10.3389/fmicb.2018.00594.
- Simons, A., Alhanout, K., and Duval, R. E. (2020). Bacteriocins, antimicrobial peptides from bacterial origin: overview of their biology and their impact against multidrug-resistant bacteria. *Microorganisms* 8, 639. doi:10.3390/microorganisms8050639.
- Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M., and Panda, A. K. (2015). Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microb Cell Fact* 14, 41. doi:10.1186/s12934-015-0222-8.
- Soltani, S., Hammami, R., Cotter, P. D., Rebuffat, S., Said, L. B., Gaudreau, H., et al. (2021). Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: toxicity aspects and regulations. *FEMS Microbiol Rev.* doi:10.1093/femsre/fuaa039.
- Stern, N. J., Svetoch, E. A., Eruslanov, B. V., Perelygin, V. V., Mitsevich, E. V., Mitsevich, I. P., et al. (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. doi:10.1128/AAC.00259-06.
- Suardíaz, R., Lythell, E., Hinchliffe, P., Kamp, M. van der, Spencer, J., Fey, N., et al. (2021). Catalytic mechanism of the colistin resistance protein MCR-1. *Org. Biomol. Chem.* 19, 3813–3819. doi:10.1039/D0OB02566F.
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., and Morris, J. G. (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 649–659. doi:10.1128/AAC.45.3.649-659.2001.
- Teo, J. W., Chew, K. L., and Lin, R. T. (2016). Transmissible colistin resistance encoded by *mcr-1* detected in clinical *Enterobacteriaceae* isolates in Singapore. *Emerg Microbes Infect* 5, e87. doi:10.1038/emi.2016.85.
- Thapa, R. K., Winther-Larsen, H. C., Ovchinnikov, K., Carlsen, H., Diep, D. B., and Tønnesen, H. H. (2021). Hybrid hydrogels for bacteriocin delivery to infected wounds. *Eur J Pharm Sci* 166, 105990. doi:10.1016/j.ejps.2021.105990.
- Thumm, G., and Götz, F. (1997). Studies on polysostaphin processing and characterization of the lysostaphin immunity factor (Lif) of *Staphylococcus simulans* biovar staphylolyticus. *Mol Microbiol* 23, 1251–1265. doi:10.1046/j.1365-2958.1997.2911657.x.
- Todorov, S. D., and Dicks, L. M. T. (2005). *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. *Enzyme Microb. Technol.* 36, 318–326. doi:10.1016/j.enzmictec.2004.09.009.
- Tripathi, N. K. (2016). Production and purification of recombinant proteins from *Escherichia coli*. *ChemBioEng Rev.* 3, 116–133. doi:10.1002/cben.201600002.
- Turovskiy, Y., Kashtanov, D., Paskhover, B., and Chikindas, M. L. (2007). “Quorum Sensing: Fact, Fiction, and Everything in Between,” in *Advances in Applied Microbiology* (Academic Press), 191–234. doi:10.1016/S0065-2164(07)62007-3.
- Umu, Ö. C. O., Rudi, K., and Diep, D. B. (2017). Modulation of the gut microbiota by prebiotic fibres and bacteriocins. *Microb. ecol. health dis* 28, 1348886. doi:10.1080/16512235.2017.1348886.
- Uzelac, G., Kojic, M., Lozo, J., Aleksandrak-Piekarczyk, T., Gabrielsen, C., Kristensen, T., et al. (2013). A Zn-dependent metallopeptidase is responsible for sensitivity to LsbB, a class II leaderless bacteriocin of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGMN1-5. *J. Bacteriol. Res.* 195, 5614–5621. doi:10.1128/JB.00859-13.
- van Belkum, M. J., Martin-Visscher, L. A., and Vederas, J. C. (2011). Structure and genetics of circular bacteriocins. *Trends Microbiol* 19, 411–418. doi:10.1016/j.tim.2011.04.004.
- Vezina, B., Rehm, B. H. A., and Smith, A. T. (2020). Bioinformatic prospecting and phylogenetic analysis reveals 94 undescribed circular bacteriocins and key motifs. *BMC Microbiol* 20, 77. doi:10.1186/s12866-020-01772-0.
- Voet, D., and Voet, J. G. (2016). *Biochimie*. De Boeck Superieur.
- Vuyst, L. D., and Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J MOL MICROB BIOTECH* 13, 194–199. doi:10.1159/000104752.

- Wachsman, M. B., Fariás, M. E., Takeda, E., Sesma, F., de Ruiz Holgado, A. P., de Torres, R. A., et al. (1999). Antiviral activity of enterocin CRL35 against herpesviruses. *Int J Antimicrob Agents* 12, 293–299. doi:10.1016/s0924-8579(99)00078-3.
- Wan, X., Li, R., Saris, P. E. J., and Takala, T. M. (2013). Genetic characterisation and heterologous expression of leucocin C, a class IIa bacteriocin from *Leuconostoc carnosum* 4010. *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 3509–3518. doi:10.1007/s00253-012-4406-4.
- Willey, J. M., and van der Donk, W. A. (2007). Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annu Rev Microbiol* 61, 477–501. doi:10.1146/annurev.micro.61.080706.093501.
- Wilson-Stanford, S., and Smith, L. (2011). Commercial development and application of type A lantibiotics. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 6, 175–185. doi:10.2174/157489111796064632.
- Yang, R., and Ray, B. (1994). Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. doi:10.1006/FMIC.1994.1032.
- YUE, T., PEI, J., and YUAN, Y. (2013). Purification and characterization of anti-alicyclobacillus bacteriocin produced by *Lactobacillus rhamnosus*. *J. Food Prot.* 76, 1575–1581. doi:10.4315/0362-028X.JFP-12-496.
- Zhou, Y., Lu, Z., Wang, X., Selvaraj, J. N., and Zhang, G. (2018). Genetic engineering modification and fermentation optimization for extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 102, 1545–1556. doi:10.1007/s00253-017-8700-z.