



HAL
open science

Étude des mécanismes d'action de bactériocines de la sous classe IIa

Jordane Jasniewski

► **To cite this version:**

Jordane Jasniewski. Étude des mécanismes d'action de bactériocines de la sous classe IIa. Autre. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2008. Français. NNT : 2008INPL100N . tel-01753062

HAL Id: tel-01753062

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01753062>

Submitted on 29 Mar 2018

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

NANCY-UNIVERSITE
INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

Laboratoire de Science et Génie Alimentaires

THESE

Présentée à l'Institut National Polytechnique de Lorraine par

Jordane JASNIEWSKI

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

Etude des mécanismes d'action de bactériocines de la sous-classe IIa

Soutenue publiquement le 9 décembre 2008 devant la commission d'examen

Rapporteurs :

M. Frédéric Leroy, Professeur, Vrije Universiteit Brussel, Belgique

M. Hervé Prévost, Professeur, ENITIAA de Nantes, France

Examineurs :

Mme Anne-Marie Revol-Junelles, Maître de conférences HDR (Directeur de thèse), ENSAIA, Nancy, France

Mme Catherine Cailliez-Grimal, Maître de conférences HDR (Co-directeur de thèse), ENSAIA, Nancy, France

Invité :

M. Eric Gelhaye, Maître de conférences HDR, UHP, Nancy, France

NANCY-UNIVERSITE
INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

Laboratoire de Science et Génie Alimentaires

THESE

Présentée à l'Institut National Polytechnique de Lorraine par

Jordane JASNIEWSKI

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

Etude des mécanismes d'action de bactériocines de la sous-classe IIa

Soutenue publiquement le 9 décembre 2008 devant la commission d'examen

Rapporteurs :

M. Frédéric Leroy, Professeur, Vrije Universiteit Brussel, Belgique

M. Hervé Prévost, Professeur, ENITIAA de Nantes, France

Examineurs :

Mme Anne-Marie Revol-Junelles, Maître de conférences HDR (Directeur de thèse), ENSAIA, Nancy, France

Mme Catherine Cailliez-Grimal, Maître de conférences HDR (Co-directeur de thèse), ENSAIA, Nancy, France

Invité :

M. Eric Gelhaye, Maître de conférences HDR, UHP, Nancy, France

Remerciements

Ce travail s'est déroulé au Laboratoire de Science et Génie Alimentaires de l'ENSAIA-INPL de Nancy. Je remercie le Professeur Stéphane Désobry pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

J'exprime toute ma reconnaissance à Madame Anne-Marie Revol-Junelles, Maître de conférences HDR à l'ENSAIA et à Madame Catherine Cailliez-Grimal, Maître de conférences HDR à l'IUT Nancy-Brabois pour avoir accepté de diriger ce travail. Je leur exprime toute ma gratitude pour leur bonne humeur, leur patience, leur encadrement, leurs conseils ainsi que pour avoir patiemment corrigé ce document et les articles.

Je remercie également Monsieur le Professeur Jean-Bernard Millère (IUT Nancy-Brabois) pour ses conseils et ses corrections.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur Frédéric Leroy, Professeur au Research Group of Industrial Microbiology and Food Biotechnology (IMDO), Vrije Universiteit Brussel, Belgique et à Monsieur Hervé Prevost, Professeur à l'UMR-INRA 1014 SECALIM ENITIAA de Nantes qui ont accepté de juger ce travail en qualité de rapporteurs.

Je remercie Monsieur Eric Gelhaye, Maître de conférences HDR à la Faculté des Sciences de Nancy, Monsieur Mohamed Younsi, Docteur à la Faculté de Médecine de Nancy et Madame Isabelle Chevalot, Maître de conférences à l'ENSAIA pour leur collaboration scientifique.

Je remercie la toute nouvelle recrue, Monsieur le Docteur Frédéric Borges, pour ses corrections et surtout son amitié.

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel de l'ENSAIA qui me connaît et particulièrement celui du LSGA, et surtout Anne, M^{lle} Turban, Delphine, Myriam, Cédric, Jean-Louis, Stéphane, Emmanuel R. et Emmanuel G.

Un grand merci à tous mes compagnons de galère : Eric, Guillaume.

Inam et Thibaut, bon courage car la votre commence...

Je remercie Greg, Willy, Gogi, Mike, Bienbien, Christin, Charlie, Alain, Franck, FX et Audrey pour leur amitié...

J'embrasse Noémie pour son amour et pour m'avoir supporté tout au long de ce travail. Je remercie également toute sa famille, c'est un plaisir de partager ma vie avec vous, en particulier Marie-Anne, Jean-Daniel, Mélanie et son « Roumain » Loïc, Emeline et son pianiste Julien. Je remercie la famille Hasser dans son ensemble avec une petite dédicace au père des naines...

Enfin, un grand merci à mes parents qui m'ont encouragé dans toutes mes entreprises et à mon frère à qui je tiens à dédicacer ce travail...

A Cédric...

Table des matières

Liste des figures hors publications.....	1
Liste des tableaux hors publications.....	1
Liste des abréviations.....	2
Introduction.....	5
Chapitre I : Synthèse bibliographique	9
I. Les bactériocines des bactéries lactiques	9
I.1 Définition.....	9
I.2 Classification	9
II. Organisation	14
II.1 Eléments génétiques du locus.....	14
II.2 La production des bactériocines	15
II.2.1 Sécrétion des bactériocines.....	15
II.2.2 Régulation de l'expression	19
II.3 Immunité	21
III. Les bactériocines de la sous-classe IIa	23
III.1 Structure	23
III.2 Rôle des différentes régions de la bactériocine	26
III.3 Spectre d'activité.....	31
IV. Mode et mécanismes d'action.....	35
IV.1 Quantification de l'activité antibactérienne	35
IV.1.1 Détermination du titre en bactériocine.....	35
IV.1.2 Facteurs physico-chimiques influençant l'activité des bactériocines.....	36
IV.2 Mode d'action	38
IV.3 Mécanisme d'action.....	39
IV.3.1 Adsorption et structuration de la bactériocine.....	39
IV.3.2 Insertion de la bactériocine et formation de pores dans la cellule cible.....	41
IV.3.3 Les conséquences de la présence de pores	43
IV.3.4 Méthodes pour l'étude du mécanisme d'action.....	44
V. La résistance aux bactériocines	47
V.1 Les différents types de résistants.....	48
V.2 Les caractéristiques des résistants	50
VI. La production et la purification des bactériocines	53
VI.1 Purification.....	53
VI.2 Améliorations de la production.....	55
Chapitre II : Résultats	61
I. Analyse du mécanisme d'action de la mésentéroïne 52A par anisotropie de fluorescence	61
I.1 Introduction.....	61
I.2 "Fluorescence anisotropy analysis of the mechanism of action of mesenterocin 52A: speculations on antimicrobial mechanism"	62
I.3 Contribution de l'article.....	72
II. Différences fonctionnelles entre des souches de <i>Leuconostoc</i> sp. sensibles ou résistantes à la mésentéroïne 52A, une bactériocine de la sous-classe IIa.....	74
II.1 Introduction.....	74
II.2 "Functional differences in <i>Leuconostoc</i> sensitive and resistant strains to mesenterocin 52A, a class IIa bacteriocin"	75
II.3 Contribution de l'article	85
III. Optimisation des procédés de production et de purification des carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2 de <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> CP5 produites par expression hétérologue chez <i>Escherichia coli</i>	88
III.1 Introduction.....	88
III.2 "Optimization of the production and purification processes of carnobacteriocins Cbn BM1 and Cbn B2 from <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> CP5 by heterologous expression in <i>Escherichia coli</i> "	88

III.3 Contribution de l'article	97
IV. Interactions entre les deux carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2 de <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> CP5 sur des bactéries et des cellules Caco-2 cibles	99
IV.1 Introduction.....	99
IV.2 "Interactions between two carnobacteriocins Cbn BM1 and Cbn B2 from <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> CP5 on target bacteria and Caco-2 cells".....	99
IV.3 Contribution de l'article	105
Chapitre III : Conclusion générale et perspectives	107
Références bibliographiques	115

Liste des figures hors publications

Figure 1 : structure de la nisine A.....	10
Figure 2 : structure (A) : de la mesarcidine produite par <i>Bacillus subtilis</i> (Hsu <i>et al.</i> , 2003) ; (B) : de la mutacine II produite par <i>Streptococcus mutans</i> (Krull <i>et al.</i> , 2000) ; (C) : structures des résidus d'acides aminés inhabituels.....	10
Figure 3 : organisation générale des opérons producteurs de bactériocines.....	15
Figure 4 : systèmes de transport et de maturation des prébactériocines de bactéries lactiques.....	17
Figure 5 : schéma simplifié du système général de sécrétion <i>Sec</i>	18
Figure 6 : exemple de « <i>quorum-sensing</i> » chez <i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	19
Figure 7 : séquence et structure tridimensionnelle de la carnobactériocine B2 (Cbn B2) et de sa protéine d'immunité (ImB2).....	21
Figure 8 : modélisation moléculaire de l'interaction ionique entre la carnobactériocine Cbn B2 et la protéine d'immunité ImB2.....	22
Figure 9 : simulations moléculaires dynamiques de la carnobactériocine Cbn B2 et de sa protéine d'immunité ImB2 dans un environnement mimant la membrane cytoplasmique.....	22
Figure 10 : alignement de séquences de différentes bactériocines de la sous-classe IIa.....	24
Figure 11 : superposition de la structure en hélice α de la leucocine A.....	25
Figure 12 : superposition du tryptophane 18 et de la phénylalanine 22 de la carnobactériocine Cbn B2 (rouge) et de la leucocine A (jaune).....	25
Figure 13 : modèles des mécanismes d'action des bactériocines.....	42

Liste des tableaux hors publications

Tableau 1 : les bactériocines produites par le genre <i>Carnobacterium</i>	12
Tableau 2 : les bactériocines produites par le genre <i>Leuconostoc</i>	13
Tableau 3 : exemples de localisation des gènes producteurs de bactériocines.....	14
Tableau 4 : activités antibactériennes de la mésentérocin 52A (Mes 52A).....	33
Tableau 5 : activités antibactériennes des carnobactériocines BM1 (Cbn BM1) et B2 (Cbn B2).....	34
Tableau 6 : effets de composés chimiques sur l'activité des bactériocines.....	37
Tableau 7 : conséquences cellulaires dues à l'action de peptides antibactériens.....	45

Liste des abréviations

Acides aminés :

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

Milieux de culture :

MRS : Man Rogosa Sharpe	TSB : Trypcase Soya Broth
TSA : Trypticase Soya Agar	YE : Yeast Extract (extrait de levure)

Bactériocines :

Cbn BM1 : carnobactériocine BM1	Mes 52A : mésentéroïne 52A
Cbn B2 : carnobactériocine B2	
Cbn BM1 M ₄₁ →V : carnobactériocine BM1 dont la Mét en position 41 est remplacée par une Val	

Concentrations inhibitrices :

CMB (MBC) : concentration minimale bactéricide	FIC : fraction de concentration inhibitrice
CMI (MIC) : concentration minimale inhibitrice	IC ₅₀ : concentration inhibant 50 % de la croissance

Unités :

AU (UA) : unité arbitraire	M, mM, μM : mole, millimole, micromole par litre
°C : degré Celsius	min : minute
cm, mm, μm : centimètre, millimètre, micromètre	pb : paire de base
g, mg, μg : gramme, milligramme, microgramme	rpm : rotation par minute
h : heure	s : seconde
kDa : kilodalton	UFC (cfu) : unité formant colonie
L, mL, μL : Litre, millilitre, microlitre	

Produits chimiques :

CNBr : Cyanogen Bromide

DPH : 1,6-Diphényl-1,3,5-hexatriène

DTT : dithiothréitol

EDTA : acide éthylènediamine-tétra-acétique

EGTA : acide éthylène glycol-bis (2-aminoéthylether)-*N,N,N',N'*-tétra-acétique

IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

TMA-DPH : N,N,N-Triméthyl-4-(6-phényl-1,3,5-hexatrien-1-yl)phénylammonium p-toluenesulfonate

TRIS : 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol

X²⁺ : cations divalents

Techniques :

ELISA : *Enzyme Link ImmunoSorbent Assay*

HPLC : *High Performance Liquid Chromatography* (Chromatographie Liquide Haute Performance)

IMAC : *Immobilized ion Metal Affinity Chromatography* (Chromatographie d'affinité sur métal immobilisé)

ITC : *Isothermal Titration Calorimetry*

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RP-HPLC : *Reverse Phase- High Performance Liquid Chromatography*

RT-PCR : *Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction*

SDS-PAGE : *sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

Collections et lieux :

ATCC : *American Type Culture Collection*

CIP : Collection de l'Institut Pasteur

DSM : *Deutsche Sammlung von Mikro-Organismen und Zellkulturen*

ENITIAA : Ecole Nationale d'Ingénieurs des Techniques des Industries Agricoles et Alimentaires

ENSAIA : Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

INPL: Institut National Polytechnique de Lorraine

INRA : Institut National de la Recherche

Agronomique

LMA : Laboratoire de Microbiologie Alimentaire

UHP : Université Henri Poincaré

Souches bactériennes

B. : *Bacillus*

C. : *Carnobacterium*

Cl. : *Clostridium*

E. : *Enterococcus*

E. coli : *Escherichia coli*

L. : *Listeria*

Lb. : *Lactobacillus*

Lc. : *Lactococcus*

Ln. : *Leuconostoc*

P. : *Pediococcus*

S. : *Streptococcus*

W. : *Weisella*

sp. : espèce

ssp ou subsp : sous-espèce

Autres abréviations :

ABC : *ATP Binding Cassette*

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATP : adénosine triphosphate

ATPase : ATP synthétase

aw : *available water*

ΔpH : gradient de proton

$\Delta\Psi$: potentiel de membrane

DTS : *Dedicated Transport System*

FPM : force protomotrice

MFP : *Membrane Fusion Protein*

N.D : non déterminé

NICE : *Nisin-Controlled gene Expression*

Pi : point isoélectrique

PTS : *phosphotransferase system*

Sec : *Secretion system complex*

SRP : *Signal Recognition Particle*

Introduction

Introduction

Au fil de l'évolution, les organismes se sont dotés de systèmes de défense pour lutter contre les infections. Certains de ces systèmes reposent sur la synthèse de peptides antibactériens tels que les défensines chez les mammifères, les magainines chez les amphibiens et les cératoxines chez les insectes.

Le règne bactérien ne fait pas exception et de nombreuses bactéries ont développé ce type de stratégies pour avoir un avantage adaptatif et ainsi coloniser plus facilement leur environnement. Les bactéries lactiques, utilisées dans de nombreux procédés alimentaires, limitent les contaminations des aliments par les germes indésirables. Cette capacité est liée à la synthèse de molécules antibactériennes telles que des acides organiques, notamment l'acide lactique, du peroxyde d'hydrogène et des bactériocines.

Les bactériocines pourraient être des conservateurs alimentaires intéressants à l'échelle industrielle du fait de leur thermostabilité, de leur spectre d'activité relativement étroit comprenant généralement le genre *Listeria* et de leur activité à de faibles concentrations sur une large gamme de valeur de pH. Actuellement, seule la nisine (E234) produite par *Lactococcus lactis* est autorisée dans le domaine alimentaire comme conservateur. En effet, un phénomène non négligeable freine l'utilisation des bactériocines à grande échelle : l'apparition de souches résistantes. Pour éviter de commettre les mêmes erreurs que celles faites avec les antibiotiques, des recherches approfondies doivent être menées sur les peptides antibactériens.

Trois grands axes de recherche sur les bactériocines ont été développés durant ces vingt dernières années.

Le premier consiste en la recherche de nouvelles souches productrices, en la purification des peptides antibactériens et en leurs caractérisations chimiques et génétiques. De nouvelles souches et de nouvelles bactériocines sont encore décrites de nos jours.

Le second axe consiste en la recherche d'applications alimentaires en utilisant soit les peptides purifiés, soit les souches productrices. Les principaux modèles d'aliments sont les produits laitiers, les poissons, les fruits de mer, les charcuteries et les viandes sous vide. Les dernières études dans ce domaine portent sur la physiologie de la souche productrice dans ces matrices complexes et sur le phénomène de « *quorum-sensing* ».

Le dernier axe porte sur l'étude des mécanismes d'action des bactériocines, de la relation structure/fonction, des interactions entre bactériocines et membranes artificielles, de

l'immunité naturelle et de la résistance acquise. Le modèle le mieux caractérisé est celui de l'interaction entre la nisine et *Listeria monocytogenes*. De nombreux travaux sont également réalisés sur diverses bactériocines de sous-classe IIa, dont les plus étudiées sont la pédiocine PA-1, la lactococcine A et la carnobactériocine Cbn B2.

Cette thèse s'inscrit dans la continuité des travaux menés au laboratoire sur la compréhension des mécanismes d'action des bactériocines de la sous-classe IIa ainsi que sur l'étude des phénomènes de résistance.

Leuconostoc mesenteroides subsp. *mesenteroides* FR52 produit deux bactériocines purifiées et caractérisées au laboratoire, la mésentéroïne 52A appartenant à la sous-classe IIa, et la mésentéroïne 52B, appartenant à la sous-classe IIc.

Lors de précédents travaux portant sur les mécanismes de résistance aux mésentéroïnes 52A et 52B, un modèle complexe avait été établi. Il comprenait un large panel de souches appartenant au genre *Leuconostoc-Weissella* sensibles, insensibles et résistantes ainsi que deux bactériocines, la mésentéroïne 52A et la mésentéroïne 52B. Aucune corrélation directe entre les phénotypes de résistance ou de sensibilité et un changement dans la composition en phospholipides ou en acides gras de la membrane n'avait pu être mise en évidence. Cependant, de légères variations au niveau de ces compositions membranaires couplées à des changements morphologiques dus à une modification de la paroi laissaient suggérer que le phénotype de résistance était dû à plusieurs facteurs. La complexité du modèle n'avait pas permis de mettre en relation composition membranaire et mécanismes de sensibilité/résistance peut être en raison de l'absence d'un modèle unique expliquant ces phénomènes. L'existence de mécanismes différents selon les souches cibles étudiées a ainsi été envisagé.

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de ces peptides antibactériens, le modèle d'étude préalablement établi a été simplifié. Il comporte une seule bactériocine de la sous-classe IIa, la mésentéroïne 52A, disponible sous forme de peptide de synthèse en grande quantité. Deux souches appartenant au genre *Listeria* ont été retenues pour leur sensibilité à la mésentéroïne 52A ainsi que trois souches appartenant au genre *Leuconostoc* pour leur caractère de sensibilité, d'insensible ou de résistance vis-à-vis de cette bactériocine.

La pénétration de la bactériocine dans la membrane de la cellule cible a été étudiée en utilisant une approche originale, la mesure de la fluidité membranaire par anisotropie de fluorescence. Les différentes conséquences de la pénétration du peptide antibactérien sur le

fonctionnement de la membrane ont été caractérisées. La caractérisation des propriétés physico-chimiques de l'enveloppe a été abordée.

Afin de pouvoir généraliser les résultats observés avec la mésentéroïne 52A à d'autres bactériocines de la sous-classe IIa, il est nécessaire de pouvoir disposer de quantités importantes de bactériocines avec un haut degré de pureté. Les carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2, produites par une souche modèle du laboratoire, *Carnobacterium maltaromaticum* CP5, ont été produites par expression hétérologue chez un hôte bactérien puis purifiées. Le mode d'action de ces bactériocines a ainsi pu être caractérisé.

La revue bibliographique présente l'état de l'art sur la compréhension des mécanismes d'action des bactériocines. Les résultats obtenus lors de cette thèse sont présentés sous forme d'un recueil de publications scientifiques.

Le mécanisme d'action de la mésentéroïne 52A est caractérisé sur deux espèces bactériennes appartenant au genre *Listeria* (publication acceptée dans Applied Microbiology and Biotechnology).

Les différences de comportement en présence de mésentéroïne 52A de souches de *Leuconostoc* sensibles ou résistantes à cette bactériocine sont analysées (publication acceptée dans FEMS Microbiology Letters).

La production des carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2 par expression hétérologue chez *Escherichia coli* est optimisée par culture en fermenteur selon un procédé « Fed-batch » (publication acceptée dans Journal of Microbiological Methods).

Le mode d'action des carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2, seules ou en combinaison, est étudié sur des cellules procaryotes ou eucaryotes (publication soumise dans le journal Food Chemical and Toxicology)

Les conclusions générales et les perspectives que laissent entrevoir ce travail sont présentées dans le dernier chapitre de cette thèse.

Publications

Jasniewski, J., C. Cailliez-Grimal, M. Younsi, J. B. Millière and A. M. Revol-Junelles. 2008. Fluorescence anisotropy analysis of the mechanism of action of mesenterocin 52A: speculations on antimicrobial mechanism. Appl Microbiol Biotechnol. Sous presse. IF₂₀₀₇ : 2,475

Jasniewski, J., C. Cailliez-Grimal, M. Younsi, J. B. Millière and A. M. Revol-Junelles. 2008. Functional differences in *Leuconostoc* sensitive and resistant to mesenterocin 52A, a class IIa bacteriocin. FEMS Microbiol Lett. Sous presse. IF₂₀₀₇ : 2.274

Jasniewski, J., C. Cailliez-Grimal, E. Gelhaye, and A. M. Revol-Junelles. 2008. Optimization of the production and purification processes of carnobacteriocins Cbn BM1 and Cbn B2 from *Carnobacterium maltaromaticum* CP5 by heterologous expression in *Escherichia coli*. J Microbiol Methods. **73**, 41-48. IF₂₀₀₇ : 2,153

Jasniewski, J., I. Chevalot, C. Cailliez-Grimal, J. B. Millière and A. M. Revol-Junelles. 2008. Interactions between two carnobacteriocins Cbn BM1 and Cbn B2 from *Carnobacterium maltaromaticum* CP5 on target bacteria and Caco-2 cells. Food Chem Toxicol. Acceptée. IF₂₀₀₇ : 2,186

Communication affichée

Jasniewski, J., C. Cailliez-Grimal, F. Borges, J. B. Millière and A. M. Revol-Junelles. 2008. Mechanism of action of the class IIa bacteriocin mesenterocin 52 from *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52. 9th Symposium on Lactic Acid Bacteria, Egmond aan Zee, The Netherlands august 31th- september 4th.

*Synthèse
bibliographique*

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. Les bactériocines des bactéries lactiques

L'homme utilise depuis longtemps, consciemment ou non, les propriétés antibactériennes des bactéries lactiques. Ces propriétés se sont avérées être intéressantes pour la conservation des aliments dans lesquels cette flore se développe. Les bactéries lactiques inhibent le développement de certains micro-organismes grâce à la synthèse de molécules antibactériennes parmi lesquelles se trouvent les bactériocines.

I.1 Définition

Contrairement aux antibiotiques classiques, les bactériocines sont synthétisées par voie ribosomique généralement par des bactéries à Gram positif appartenant au groupe des bactéries lactiques. Elles peuvent subir ou non des modifications post-traductionnelles avant d'être excrétées dans le milieu extracellulaire. Leur spectre d'action antibactérien, généralement étroit, comprend souvent des souches appartenant à la même espèce que la souche productrice. Cette dernière produit une protéine d'immunité pour se protéger des effets délétères de la bactériocine qu'elle produit (Jack *et al.*, 1995).

I.2 Classification

Il existe plusieurs classifications. La première est fondée sur les spectres d'action (Klaenhammer 1988). Les connaissances acquises ont permis de créer une classification reposant sur les structures et les mécanismes d'action des bactériocines (Klaenhammer 1993). Cette dernière a été modifiée par l'ajout de sous-classes et est actuellement utilisée (Nes *et al.*, 1996 ; Diep *et al.*, 2002).

Cette classification se décompose en quatre classes distinctes :

- **Classe I** : il s'agit de peptides de taille réduite (< 5 kDa) contenant des acides aminés inhabituels obtenus par modifications post-traductionnelles. Un de ces acides aminés caractéristiques est la lanthionine ; c'est pourquoi les bactériocines appartenant à la classe I sont appelées lantibiotiques pour "*lanthionine containing antibiotics*". La nisine est la bactériocine de la classe I la plus étudiée. La structure de ces bactériocines diffère selon la localisation des ponts établis entre les acides aminés inhabituels (Twomey *et al.*, 2002).

Il existe deux types de lantibiotiques selon leur structure.

Les lantibiotiques de type A regroupent les peptides linéaires, comme la nisine A, qui forme des pores dans la membrane de la cellule cible (Figure 1) (Buchman *et al.*, 1988).

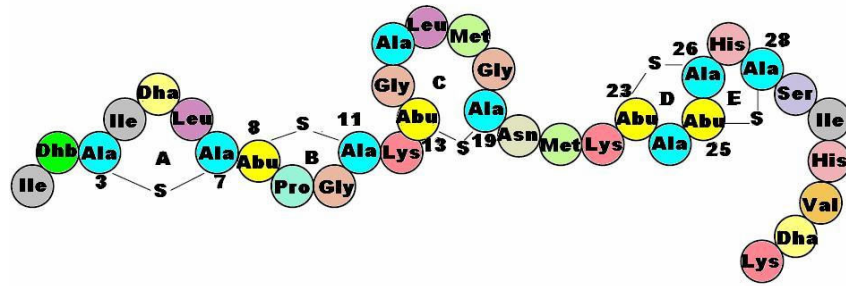


Figure 1 : structure de la nisine A

Les antibiotiques de type B regroupent les bactériocines globulaires, dont la plus connue est la mersacidine (Figure 2A). Le mécanisme d'action de cette bactériocine, tout comme celui de la nisine, est fondé sur la liaison avec le lipide II, non pour former un pore, mais pour inhiber la synthèse de la paroi, notamment la transpeptidation, ou de certaines phospholipases (Hsu *et al.*, 2003).

Certains antibiotiques n'appartiennent ni au type A ni au type B, comme la mutacine II (Woodruff *et al.*, 1998) (Figure 2B). C'est un peptide de petite taille (3245 Da) qui contient une β -méthyllanthionine ainsi que deux lanthionines en plus d'un acide aminé didéshydrogéné. Ce lantibiotique, de par sa petite taille, ne peut pas former de pore au sein de la bicouche lipidique de la cellule cible (Chikindas *et al.*, 1995a). Ces peptides antibactériens agissent sur le potentiel de membrane ($\Delta\Psi$) ainsi que sur le gradient de pH (ΔpH). De plus, ce peptide inhibe partiellement le transport de certains acides aminés (2- α -aminoisobutyrate et glutamate). Enfin, la mutacine II provoque la disparition du pool intracellulaire en ATP en inhibant l'ATP synthétase (Chikindas *et al.*, 1995a).

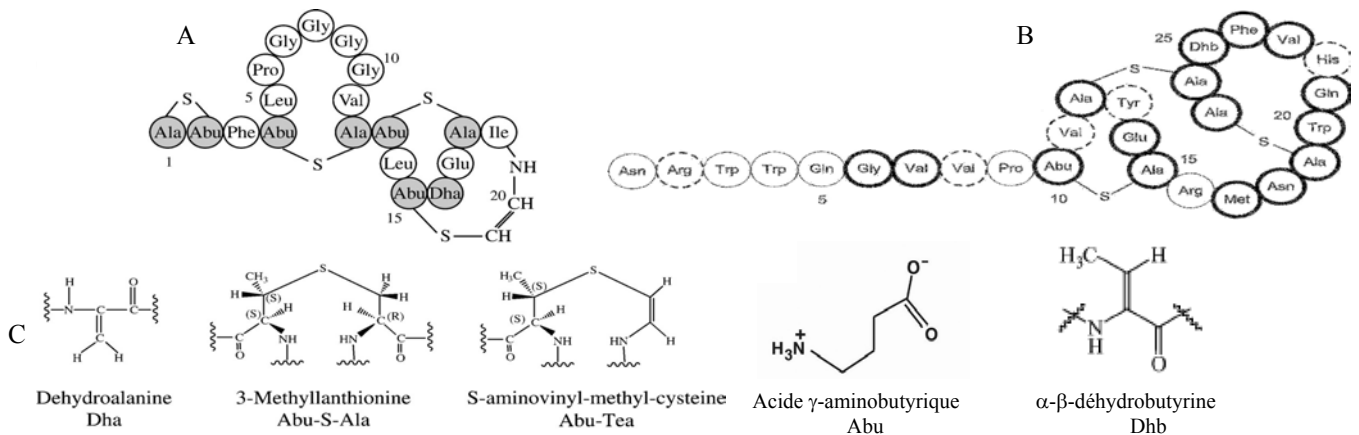


Figure 2 : structure (A) : de la mersacidine produite par *Bacillus subtilis* (Hsu *et al.*, 2003) ; (B) : de la mutacine II produite par *Streptococcus mutans* (Krull *et al.*, 2000) ; (C) : structures des résidus d'acides aminés inhabituels

Des lantibiotiques à deux composants, comme la plantaricine W (α et β) (Holo *et al.*, 2001) ou la lacticine 3147 (A1 et A2) (Dougherty *et al.*, 1998), ont été mis en évidence augmentant ainsi la complexité de cette classification.

- **Classe II** : cette classe regroupe les petites bactériocines (< 10 kDa) thermostables et ne subissant pas de modification post-traductionnelle ; cependant elles sont généralement synthétisées sous forme d'un prépeptide qui sera maturé lors de son excrétion dans le milieu extracellulaire. Le site du clivage protéolytique du peptide leader s'effectue généralement au niveau d'un doublet de glycine. Le mécanisme d'action de ces bactériocines est principalement fondé sur la perméabilisation de la membrane de la cellule cible. Les bactériocines peuvent interagir avec cette dernière. En effet, ces peptides sont hydrophobes, cationiques et adoptent une structure secondaire en hélice α en milieu apolaire (Fregeau Gallagher *et al.*, 1997 ; Wang *et al.*, 1999 ; Sprules *et al.*, 2004a).

Cette catégorie contient plus de 50 bactériocines ; avec l'acquisition de nouvelles connaissances, trois sous-classes ont été introduites :

- **Sous-classe IIa** ou « *pediocin-like* » : les bactériocines de cette sous-classe ressemblent d'un point de vue structural à la pédiocine qui fut la première bactériocine de ce groupe à être décrite. Ces bactériocines ont deux particularités, la première est la présence d'une séquence N-terminale conservée **YYGNGV-C---C-V-WG-A---I** (Ennahar *et al.*, 2000b), la deuxième est la présence d'une activité anti-*Listeria* sp. Les carnobactériocines BM1 et B2 font partie de cette sous-classe (Quadri *et al.*, 1994) ainsi que la mésentéricine Y105 (ou mésentéroïne 52A) (Hécharde *et al.*, 1992 ; Revol-Junelles *et al.*, 1996b).

- **Sous-classe IIb** : ce groupe correspond à des bactériocines possédant deux composants. L'activité optimale dépend de l'action conjuguée des deux peptides. Ils peuvent être actifs individuellement mais une synergie d'action est observée lorsqu'ils sont associés, comme par exemple pour l'entéroïne L50A/L50B (Cintas *et al.*, 1998). Ces peptides peuvent également être inactifs individuellement ; seul un mélange des deux composants permet d'observer une activité antibactérienne, comme c'est le cas pour la plantaricine JK (Diep *et al.*, 1996).

- **Sous-classe IIc** : cette catégorie était initialement réservée aux bactériocines activées par réduction de groupements thiols (« *Thiol-activated* ») (Klaenhammer 1993), comme la lactococcine B (Venema *et al.*, 1993). Cependant, la réduction d'un groupement thiol ne

semble pas indispensable à son activité antibactérienne (Venema *et al.*, 1996). D'autres auteurs (Nes *et al.*, 1996) ont proposé de dédier cette sous-classe aux bactériocines de la classe II excrétées par le système général d'excrétion (le système *sec*), car les autres bactériocines de la classe II sont excrétées par des systèmes spécifiques type ABC "ATP Binding Cassette". Deux exemples ont été décrits, l'acidocine B (Leer *et al.*, 1995) et la divergicine A (Worobo *et al.*, 1995). Cependant, des bactériocines de la sous-classe IIa, sécrétées par le système *sec*, ont été décrites, comme l'entéroïne P (Cintas *et al.*, 1997). Ces découvertes remettent en question l'existence de cette sous-classe. Finalement, la sous-classe IIc regroupe les bactériocines de la classe II ne pouvant pas être classés ni dans la sous-classe IIa ni dans la IIb (Hécharde *et al.*, 2002). La mésentéroïne 52B (mésentéricine B105) en fait partie (Revol-Junelles *et al.*, 1996b ; Hécharde *et al.*, 1999).

Récemment une bactériocine circulaire de 60 résidus d'acides aminés a été découverte. Il s'agit de la carnocycline A produite par *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307 (Martin-Visscher *et al.*, 2008b). Des bactériocines présentant cette spécificité structurale ont déjà été décrites comme la gassericine A, la circularine A (Kemperman *et al.*, 2003 ; Kawai *et al.*, 2004,) et l'entéroïne AS-48 (Maqueda *et al.*, 2008).

Dans ce travail, des souches appartenant aux genres *Carnobacterium* et *Leuconostoc* ont été utilisées. Ces deux genres bactériens produisent de nombreuses bactériocines (Tableaux 1 et 2) appartenant aux différentes classes citées précédemment.

Tableau 1 : les bactériocines produites par le genre *Carnobacterium*

Souches productrices	Bactériocines	Classe	Références
<i>C. divergens</i> 750	Divergicine 750	IIc	Holck <i>et al.</i> , 1996
<i>C. divergens</i> LV13	Divergicine A	IIc	Worobo <i>et al.</i> , 1995
<i>C. divergens</i> M35	Divergicine M35	IIa	Tahiri <i>et al.</i> , 2004
<i>C. divergens</i> V41	Divergicine V41	IIa	Metivier <i>et al.</i> , 1998
<i>C. maltaromaticum</i> UI49	Carnocine UI49	I	Stoffels <i>et al.</i> , 1992
<i>C. maltaromaticum</i> LV17B	Carnobactériocine BM1	IIa	Quadri <i>et al.</i> , 1994
<i>C. maltaromaticum</i> CP5	ou carnocine CP51		Herbin <i>et al.</i> , 1997
<i>C. maltaromaticum</i> V1	ou piscicocine V1b		Bhugaloo-Vial <i>et al.</i> , 1996
<i>C. maltaromaticum</i> LV17B	Carnobactériocine B2	IIa	Quadri <i>et al.</i> , 1994
<i>C. maltaromaticum</i> CP5	ou carnocine CP52		Herbin <i>et al.</i> , 1997
<i>C. maltaromaticum</i> LV17A	Carnobactériocine A	IIc	Worobo <i>et al.</i> , 1994
<i>C. maltaromaticum</i> JG126	ou piscicoline 61		Schillinger <i>et al.</i> , 1993
<i>C. maltaromaticum</i> V1	Piscicocine V1a	IIa	Bhugaloo-Vial <i>et al.</i> , 1996
<i>C. maltaromaticum</i> JG126	ou piscicoline 126		Jack <i>et al.</i> , 1996
<i>C. maltaromaticum</i> 213	Carnocine KZ213	II	Khouiti <i>et al.</i> , 2004
<i>C. maltaromaticum</i> CS526	Piscicocine CS526	IIa	Yamazaki <i>et al.</i> , 2005
<i>C. maltaromaticum</i> UAL307	Carnocycline A	Circulaire	Martin-Visscher <i>et al.</i> , 2008b
<i>Carnobacterium</i> sp 377	Carnocine H	II	Blom <i>et al.</i> , 2001

Tableau 2 : les bactériocines produites par le genre *Leuconostoc*

Souches productrices	Bactériocines	Classe	Références
<i>Leuconostoc</i> sp. J2	Leucocine J	N.D	Choi <i>et al.</i> , 1999
<i>Leuconostoc</i> sp. MF215B	Leucocine H	IIb	Blom <i>et al.</i> , 1999
<i>Ln. carnosum</i>	Leucocine F10	N.D	Parente <i>et al.</i> , 1996
<i>Ln. carnosum</i> Ta11a	Leucocine B	IIa	Felix <i>et al.</i> , 1994
<i>Ln. carnosum</i> LA54A	Carnocine 54	N.D	Geisen <i>et al.</i> , 1993
<i>Ln. carnosum</i> LA44A	Carnocine ?	N.D	Van Laack <i>et al.</i> , 1992
<i>Ln. carnosum</i> 4010	Leucocines 4010 ou leucocines A et C	IIa	Budde <i>et al.</i> , 2003 Hastings <i>et al.</i> , 1991 Papathanasopoulos <i>et al.</i> , 1997 Fimland <i>et al.</i> , 2002c
<i>Ln. citreum</i> KM20	Bacteriocine UviB	N.D	Kim <i>et al.</i> , 2008
<i>Ln. dextranicum</i> ST99	Mésentéroïne ST99	II	Todorov <i>et al.</i> , 2004
<i>Ln. gelidum</i> IN139	?	N.D	Harding <i>et al.</i> , 1990
<i>Ln. gelidum</i> UAL-187	Leucocine A	IIa	Hastings <i>et al.</i> , 1991
<i>Ln. mesenteroides</i> Y105 <i>Ln. mesenteroides</i> FR52	Mésentéroïne Y105 ou Mésentéroïne 52A	IIa	Hécharde <i>et al.</i> , 1992 Revol-Junelles <i>et al.</i> , 1996b
<i>Ln. mesenteroides</i> FR52 <i>Ln. dextranicum</i> J24 <i>Ln. mesenteroides</i> Y105	Mésentéroïne 52B ou dextranicine J24 ou mésentéroïne B105	IIc	Revol-Junelles <i>et al.</i> , 1996b Revol-Junelles <i>et al.</i> , 1996a Hécharde <i>et al.</i> , 1999
<i>Ln. mesenteroides</i> TA33a	Leucocine C	IIa	Papathanasopoulos <i>et al.</i> , 1997 Fimland <i>et al.</i> , 2002c
<i>Ln. mesenteroides</i> UL5	Mésentéroïne 5 ou pédiocine PA-1/AcH	IIa	Daba <i>et al.</i> , 1991 Gonzalez <i>et al.</i> , 1987 Bhunja <i>et al.</i> , 1988
<i>Ln. paramesenteroides</i> OX	Leucocine S	IV	Lewus <i>et al.</i> , 1992

N.D : non déterminé

- **Classe III** : cette classe regroupe les bactériocines de haut poids moléculaire (> 30 kDa) qui possèdent une activité antimicrobienne. Ces protéines, contrairement aux peptides de la classe II, ne sont pas thermostables. L'entérolysine A, synthétisée par *Enterococcus faecalis*, appartient à cette classe et présente une activité anti-*Listeria* sp. (Nilsen *et al.*, 2003 ; Nigutova *et al.*, 2008). Cette protéine possède dans sa région N-terminale une activité « endopeptidase-like ». De plus, sa région C-terminale est similaire au gène de lyse de bactériophages (A2, T4). Une délétion des 58 derniers résidus d'acides aminés entraîne une perte totale de son activité. Le mécanisme d'action de cette bactériocine repose sur une activité muralytique permettant la dégradation de la paroi de la cellule cible (Nilsen *et al.*, 2003).

- **Classe IV** : cette dernière classe regroupe les protéines couplées à une partie non protéique (lipide, oligosaccharide). Cette classe est très peu représentée voire éliminée (Drider *et al.*, 2006). *Leuconostoc paramesenteroides* OX produit une molécule antimicrobienne, la leucocine S, appartenant à cette classe. Cette protéine de haut poids moléculaire, thermosensible, perd totalement son activité vis-à-vis de *Lactobacillus sakei* en présence d' α -amylase, enzyme dégradant les glucides complexes. Un prétraitement de la souche cible avec cette même enzyme n'affecte pas l'activité de la leucocine S. Par conséquent, l' α -amylase agit directement sur la bactériocine et non sur un récepteur potentiel présent sur la souche sensible (Lewus *et al.*, 1992). Sa nature glycoprotéique a été confirmée lors d'une SDS-PAGE suivie d'une coloration au bleu Alcian (Lewus *et al.*, 1992).

Face à la complexité et à l'hétérogénéité de cette classification, certains auteurs ont proposé d'établir des classifications selon le genre producteur ; une classification pour les bactériocines produites par le genre *Enterococcus* est ainsi disponible (Franz *et al.*, 2007).

II. Organisation

Comme le modèle d'étude développé dans ce travail ne comporte que des bactériocines de la classe II, les aspects concernant ce type de peptides antibactériens seront développés majoritairement.

II.1 Eléments génétiques du locus

La localisation des gènes de bactériocines de la classe II peut être chromosomique, comme dans le cas de la carnobactériocine BM1 (Quadri *et al.*, 1994) ou plasmidique comme pour la carnobactériocine Cbn B2 et la mésentéricine Y105 (Hécharde *et al.*, 1992) (Tableau 3).

Tableau 3 : exemples de localisation des gènes producteurs de bactériocines

Souches productrices	Bactériocines (classe)	Gènes	Taille prébactériocine/bactériocine	Localisation des gènes	Numéro d'accession	Références
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	Carnobactériocine A (IIc)	<i>cbnA</i>	71/53	Plasmide	P38578	Worobo <i>et al.</i> , 1994
	Carnobactériocine BM1 (IIa)	<i>cbnBM1</i>	61/43	Chromosome	P38579	Quadri <i>et al.</i> , 1994
	Carnobactériocine B2 (IIa)	<i>cbnB2</i>	66/48	Plasmide	P38580	Quadri <i>et al.</i> , 1994
<i>C. divergens</i>	Divercine V41 (IIa)	<i>dvn41</i>	66/43	Chromosome	CAA11804	Metivier <i>et al.</i> , 1998
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Pédiocine PA-1 (IIa)	<i>pedA</i>	62/44	Plasmide	P29430	Marugg <i>et al.</i> , 1992
	Mésentéricine Y105 (IIa)	<i>mesY</i>	61/37	Plasmide	P38577	Hécharde <i>et al.</i> , 1992
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>						
<i>Enterococcus faecium</i>	Entéroicine P (IIa)	<i>entP</i>	71/44	Chromosome	AAC45870	Cintas <i>et al.</i> , 1997
<i>Lactobacillus curvatus</i>	Sakacine P (IIa)	<i>sppA</i>	61/43	Chromosome	AAAY44078	Cocolin <i>et al.</i> , 2007

Les gènes impliqués dans la production des bactériocines sont généralement organisés sous forme d'opéron (Figure 3). Les gènes de structure et le gène d'immunité sont généralement co-transcrits sauf quand ces derniers sont disjoints, comme dans le système carnobactériocine A (Franz *et al.*, 2000). Les éléments nécessaires au transport de la bactériocine sont généralement trouvés sur un autre locus. De plus, un troisième locus peut être identifié. Ce dernier code un système de transduction du signal. Ce système à deux ou trois composants permet l'induction de la production du peptide antimicrobien (Ennahar *et al.*, 2000b ; Diep *et al.*, 2002 ; Eijsink *et al.*, 2002).

Dans de nombreux loci de bactériocines de la classe II, la présence de gènes de régulation a pu être mise en évidence (Eijsink *et al.*, 2002) (Figure 3).

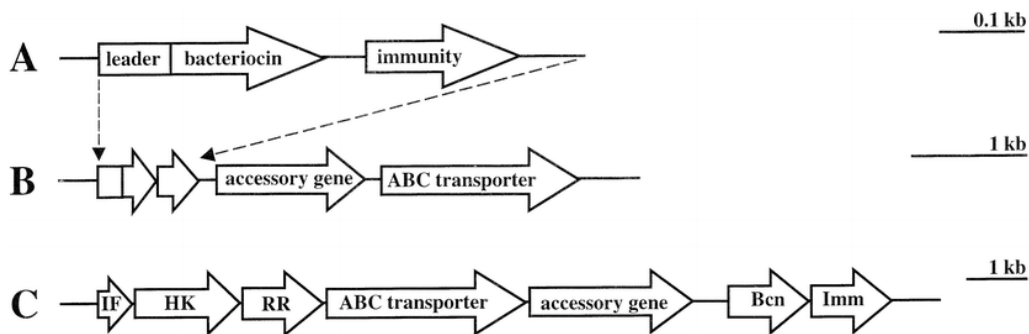


Figure 3 : organisation générale des opérons producteurs de bactériocines

A : prébactériocine et sa protéine d'immunité

B : transporteur ABC et son facteur accessoire

C : système de régulation à trois composantes

HK : Histidine Kinase ; RR : protéine de régulation ; IF : facteur d'induction

www.rsc.org

II.2 La production des bactériocines

Toutes les bactériocines sont produites par voie ribosomale dans le cytoplasme de la cellule productrice. Elles sont toujours synthétisées sous forme d'une molécule très peu active. Le peptide « signal » ou « leader », présent dans cette molécule, permet la sécrétion de la bactériocine dans le milieu extérieur.

II.2.1 Sécrétion des bactériocines

Les bactériocines de la sous-classe IIa, comme toutes les bactériocines, sont synthétisées sous forme d'un précurseur appelé prébactériocine ou préprobactériocine pour les antibiotiques. Ce prépeptide est mûri pendant ou immédiatement après sa sécrétion dans le

milieu extracellulaire. Par conséquent, c'est la prébactériocine qui est reconnue par le transporteur.

Généralement, les bactériocines de la classe II, produites par des bactéries lactiques, sont excrétées par un transporteur spécifique dit de type I. Il existe quelques bactériocines sécrétées par le système général de sécrétion *sec* (dit de type II), qui n'est pas spécifique aux bactériocines. Les éléments nécessaires au transporteur de type II sont codés par des gènes situés dans l'opéron commun avec le gène de la bactériocine. Il est cependant possible que les gènes du transporteur se situent dans un opéron adjacent.

Pour résumer, deux à trois partenaires sont impliqués dans la sécrétion de la bactériocine : le peptide leader, le transporteur (de type ABC *ATP Binding Cassette* ou du système général de sécrétion *sec*) et éventuellement un facteur accessoire associé à ce transporteur.

- Le peptide leader

Le peptide leader est indispensable pour la sécrétion de la bactériocine ; de plus, l'activité réduite du précurseur protège la bactérie contre l'action de sa propre bactériocine (Nes *et al.*, 1996).

Pour les lantibiotiques, le peptide leader pourrait être impliqué dans la maturation des probactériocines en leur conférant une conformation propice afin de faciliter la création des acides aminés rares. Toutefois, les peptides leaders ne sont jamais modifiés même lorsqu'ils possèdent des résidus sérine et thréonine (Weil *et al.*, 1990). Le peptide leader est clivé pendant ou immédiatement après la sécrétion, ce qui permet la libération de la bactériocine active dans le milieu extracellulaire (Figure 4).

Il existe deux grandes familles de peptides leaders, le type « FNLDV » (phénylalanine-asparagine-leucine-aspartate-valine) rencontré chez certaines bactériocines de la classe I, dont la nisine, et le type « GG » (pour double glycine) commun aux bactériocines de la classe II et à certains lantibiotiques. L'étape de protéolyse est réalisée par une protéase spécifique pour les peptides leaders de type « FNLDV » ou directement par le transporteur ABC pour les peptides leaders de type « GG ».

Les peptides leaders de type « FNLDV » sont généralement hydrophiles. Des résidus chargés sont fortement conservés dans la séquence consensus, comme l'aspartate (McAuliffe *et al.*, 2001). La charge nette est généralement négative mais peut, dans certains cas, être faiblement positive.

Les extensions N-terminales de type « GG » possèdent généralement une charge nette négative. La séquence consensus rencontrée dans les prébactériocines de la classe II serait ELSxxELDxIxGG alors qu'elle serait EVSxxELDxIxGA pour les probactériocines de la classe I (Nes *et al.*, 1996 ; Ennahar *et al.*, 2000b).

- Transporteur de type ABC

Le gène de structure code une prébactériocine ; celle-ci est reconnue par un transporteur spécifique formé grâce aux produits de deux gènes. Le premier code un transporteur ABC, le deuxième un facteur accessoire.

Les bactériocines, quelle que soit leur classe d'appartenance, sont généralement secrétées par des transporteurs de type ABC (Figure 4) (Nes *et al.*, 1996 ; McAuliffe *et al.*, 2001). Ce transport actif permet de les sécréter dans le milieu extérieur *via* l'hydrolyse d'ATP. Ces transporteurs sont composés de quatre sous-unités identiques deux à deux. Concernant le transporteur des bactériocines de la classe II, il peut parfois être accompagné de un ou de deux facteurs accessoires, quelquefois appelés MFP pour «*Membrane Fusion Protein*». La fonction exacte de la MFP reste encore à déterminer.

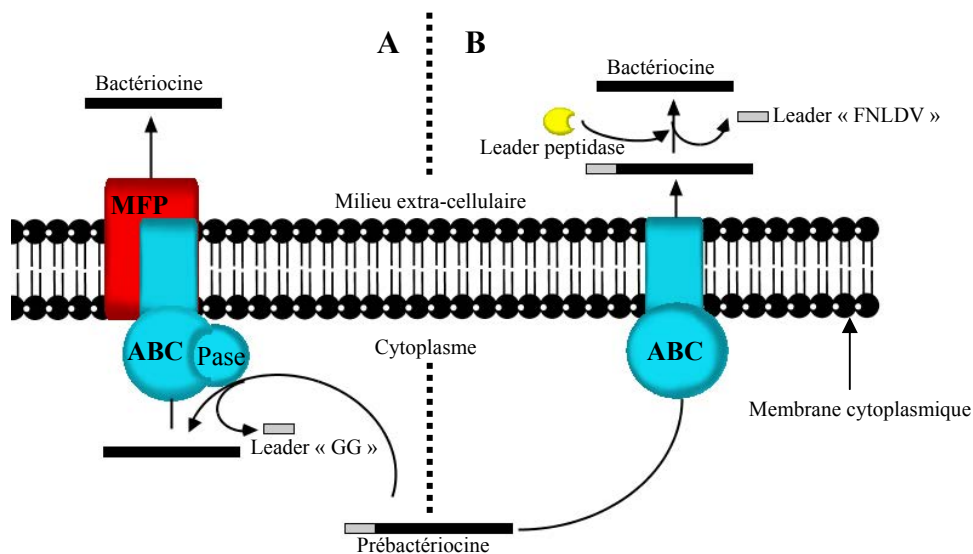


Figure 4 : systèmes de transport et de maturation des prébactériocines de bactéries lactiques

(Wandersman 1998)

(A) : avec un peptide leader de type « GG » ; (B) : avec un peptide leader de type « FNLDV »

Pase : peptidase clivant le peptide leader

- Transport par le système général de sécrétion

Certaines bactériocines, appartenant à la classe II, notamment la divergicine A (Worobo *et al.*, 1995), l'acidocine B (Leer *et al.*, 1995) ou l'entérotoxicine P (Cintas *et al.*, 1997) sont sécrétées *via* le système général de sécrétion (*Secretion system complex, Sec*) (Figure 5).

Les sous-unités de la pré-protéine translocase bactérienne sont schématisées (Figure 5, partie a). La translocase consiste en SecYEG, composé de protéines formant un pore de transport (jaune), complexé avec l'ATPase SecA (rouge), fournissant l'énergie. SecYEG peut s'associer avec le groupe auxiliaire de protéines SecDFYajC et YidC (vert). SecA, SecY et SecDFYajC sont connus pour former des oligomères, mais leurs états oligomériques dans l'holoenzyme n'ont pas encore été déterminés.

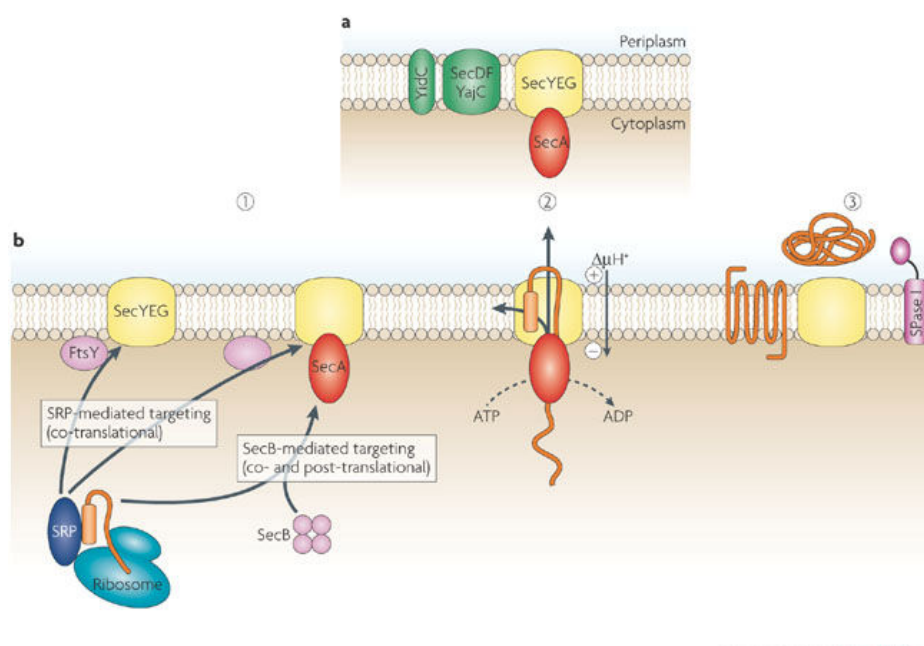


Figure 5 : schéma simplifié du système général de sécrétion *Sec* (Xie *et al.*, 2008)

Lors du processus de sécrétion (Figure 5, partie b), les pré-protéines (ligne orange épaisse) à sécréter sont synthétisées avec un peptide signal (rectangle orange). Deux voies sont possibles (phase 1) : dans la première, les pré-protéines en cours de biosynthèse par le ribosome sont acheminées sur la translocase, *via* le SRP (bleu) (*signal recognition particle*) lié au ribosome ; il s'agit alors de translocation co-traductionnelle. Ceci se produit généralement pour des protéines membranaires ou comportant un peptide signal très hydrophobe. Dans la deuxième voie, l'acheminement vers la translocase peut se dérouler après la traduction quasi complète de la protéine ; il s'agit dans ce cas de translocation co- ou post-traductionnelle. Dans cette voie, SecB, une protéine chaperone tétramérique (rose) prend en charge la protéine à sécréter. Cette voie est empruntée par les protéines devant être

sécrétées. FtsY (rose) et SecA agissent respectivement comme des récepteurs pour SRP et SecB. Les deux itinéraires fusionnent ensuite au niveau de SecYEG/FtsY ou du complexe avec SecYEG/SecA (étape 1). Certaines pré-protéines acheminées par SRP vers SecYEG sont trop polaires ; dans ce cas, SecA est également recrutée. Par souci de simplicité, SecYEG est présenté sans sous-unité auxiliaire. Les pré-protéines sont transférées par SecYEG (phase 2). Elles sont structurées lors de la traversée de la membrane cytoplasmique *via* SecYEG ou sont directement intégrées dans la bicouche lipidique après le clivage du peptide signal par la peptide signal peptidase (SPase I ; magenta) (phase 3). Le clivage du peptide signal des lipoprotéines nécessite une autre peptidase, SPase II (non montré). L'énergie du système est fournie par la fixation d'ATP sur SecA qui présente une activité ATPase et par la force protomotrice ($\Delta\Psi$ et ΔpH) dont les composants ne figurent pas sur le schéma.

II.2.2 Régulation de l'expression

L'induction de la production repose sur un mécanisme d'évaluation de la densité de la population productrice ou « *quorum-sensing* », la molécule inductrice étant soit un peptide-phéromone soit la bactériocine elle-même. Ce phénomène a été mis en évidence chez *C. maltaromaticum* (Gursky *et al.*, 2006 ; Rohde *et al.*, 2006 ; van Belkum *et al.*, 2007) (Figure 6) et chez *E. faecium* (Cotter *et al.*, 2005).

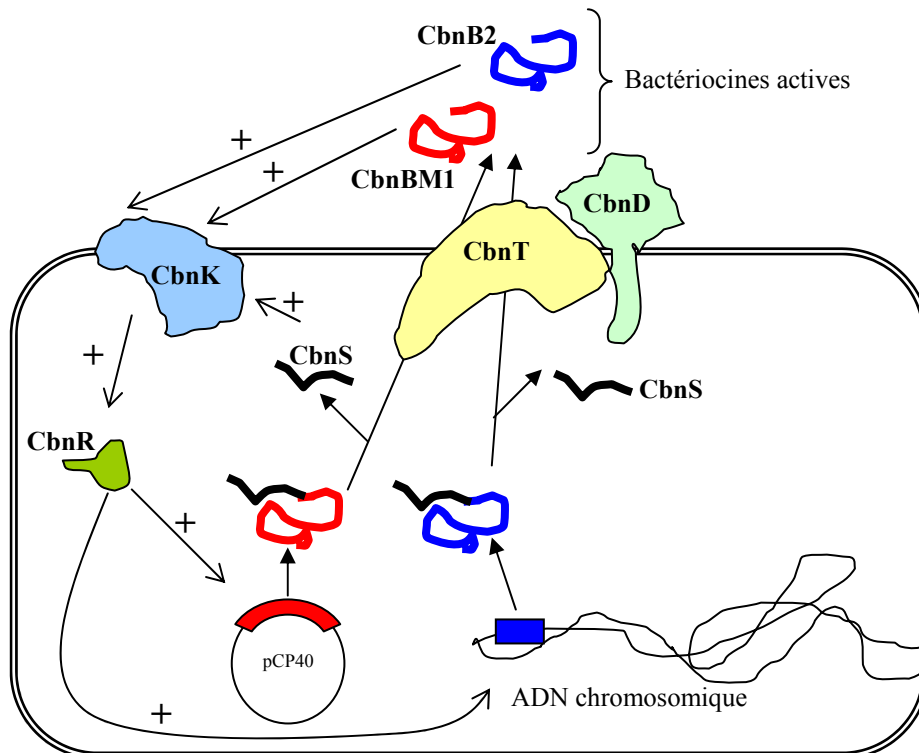


Figure 6 : exemple de « *quorum-sensing* » chez *Carnobacterium maltaromaticum* (modifié d'après www.rsc.org) (Rohde *et al.*, 2006)

Les carnobactériocines BM1 (Cbn BM1) et B2 (Cbn B2) sont produites respectivement à partir du chromosome bactérien et du plasmide pCP40. Après l'étape de traduction, les deux prébactériocines sont sécrétées par un même transporteur ABC, CbnT associé à CbnD. Les deux prébactériocines sont maturées lors du transport réalisé par ce complexe et le peptide signal (CbnS) est clivé. Les deux carnobactériocines alors actives, présentes dans le milieu extérieur, peuvent se fixer sur un « senseur », la protéine kinase CbnK. Le peptide signal présent dans le cytoplasme peut également interagir avec ce « senseur ». Les protéines kinases, activées par les bactériocines ou le peptide signal, recrutent et phosphorylent la protéine régulatrice CbnR. Cette dernière, étant phosphorylée, peut se fixer sur les opérateurs des opérons et recruter l'ARN polymérase pour augmenter l'expression des gènes codant ces bactériocines.

Bien qu'il existe des bactériocines de la classe II qui ont une activité de phéromone, la présence d'un peptide d'induction est très fréquente. Ce peptide présente des caractéristiques physico-chimiques très proches de celles des bactériocines. Il peut agir à des concentrations très faibles, de l'ordre de 10^{-17} M (Cotter *et al.*, 2005).

Dans le cas de l'entéroïcine A, produite par *E. faecium* (O'Keeffe *et al.*, 1999), la bactériocine ne joue pas le rôle de la phéromone.

La production de l'entéroïcine A implique un système à trois composantes (Cotter *et al.*, 2005). Le gène codant la bactériocine (entéroïcine A, *EntA*) et celui codant le facteur d'induction (entéroïcine F, *EntF*) sont co-transcrits à partir du promoteur *Pent*. Ces deux protéines sont alors transportées par un transporteur putatif de type ABC (*EntT*) couplé à une protéine accessoire (*EntD*). Comme pour les autres bactériocines, les deux autres composantes du système sont une histidine kinase fixée dans la membrane (*EntK*) qui détecte le peptide inducteur extracellulaire (*EntF*) et une protéine régulatrice intracytoplasmique (*EntR*). La transduction du signal est réalisée par la phosphorylation de *EntR* par *EntK*. Une fois phosphorylée, *EntR* active le promoteur *Pent* permettant ainsi d'augmenter l'expression de l'opéron de l'entéroïcine A.

Chez *Lactobacillus plantarum* C11, la plantaricine A induit sa propre production ainsi que celle de deux autres bactériocines, les plantaricines EF et JK (Diep *et al.*, 1996). L'inducteur est toujours reconnu par un système composé de deux entités, une histidine kinase membranaire et un régulateur de la réponse cytoplasmique.

Généralement, l'inducteur est un peptide spécifique ; ce dernier n'est pas modifié et est synthétisé sous la forme d'un prépeptide avec un peptide leader contenant le motif «GG». Le peptide-phéromone est mûri puis sécrété par le même transporteur que celui de la

bactériocine du même locus. Outre la plantaricine A, les peptides-phéromones sont dépourvus d'activité antibactérienne.

II.3 Immunité

Le mécanisme d'action des protéines d'immunité des bactériocines de la classe II n'est pas encore entièrement élucidé. Il existe peu d'informations sur ce sujet. Cependant, il semble que les protéines d'immunité des bactériocines de la sous-classe IIa soient essentiellement cytoplasmiques (Eijsink *et al.*, 2002), tandis que celles des bactériocines de la sous-classe IIb pourraient être localisées dans la membrane plasmique grâce à des segments transmembranaires (Allison *et al.*, 1996 ; Cintas *et al.*, 2000). La protéine d'immunité MesH d'une bactériocine de la sous-classe IIc, la mésentéricine B105, présente des segments transmembranaires. Cette localisation membranaire suggère une interaction directe entre la bactériocine et sa protéine d'immunité, mais aucun résultat expérimental ne le prouve.

Les structures tridimensionnelles de la carnobactériocine B2 et de sa protéine d'immunité (ImB2) ont été élucidées par RMN (Sprules *et al.*, 2004a ; Sprules *et al.*, 2004b). Aucune interaction directe n'a pu être révélée entre ces deux structures par modélisation moléculaire (Figure 7). L'établissement d'un pont salin entre la carnobactériocine B2 (Glu24) et sa protéine d'immunité (Arg95) a été mis en évidence par simulations dynamiques moléculaires (Figure 8) dans un environnement mimant une bicouche lipidique pour la bactériocine et un environnement aqueux pour la protéine d'immunité (Soliman *et al.*, 2007). A l'interface, la carnobactériocine B2 attire la protéine d'immunité ImB2 au sein de la bicouche *via* l'établissement de liaisons ioniques (Figure 9). Cependant, la protéine d'immunité ne peut pas pénétrer seule dans la membrane cytoplasmique afin de prévenir l'action de la bactériocine.

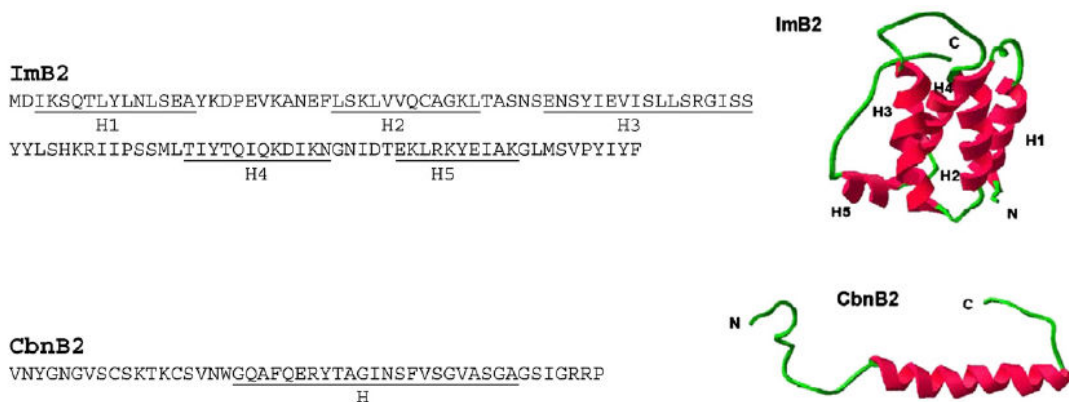


Figure 7 : séquence et structure tridimensionnelle de la carnobactériocine B2 (Cbn B2) et de sa protéine d'immunité (ImB2).

Les lettres H représentent les motifs hélices α (Soliman *et al.*, 2007)

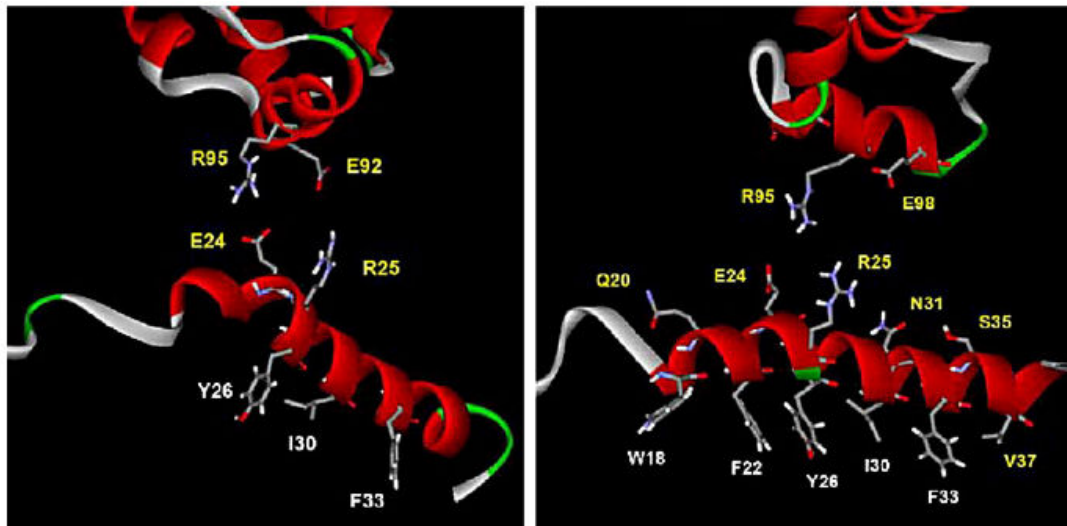


Figure 8 : modélisation moléculaire de l'interaction ionique entre la carnobactériocine Cbn B2 et la protéine d'immunité ImB2.

Quel que soit la simulation (Soliman *et al.*, 2007), l'arginine 95 de ImB2 (hélice 5) interagit avec l'aspartate 24 de l'hélice α de CbnB2

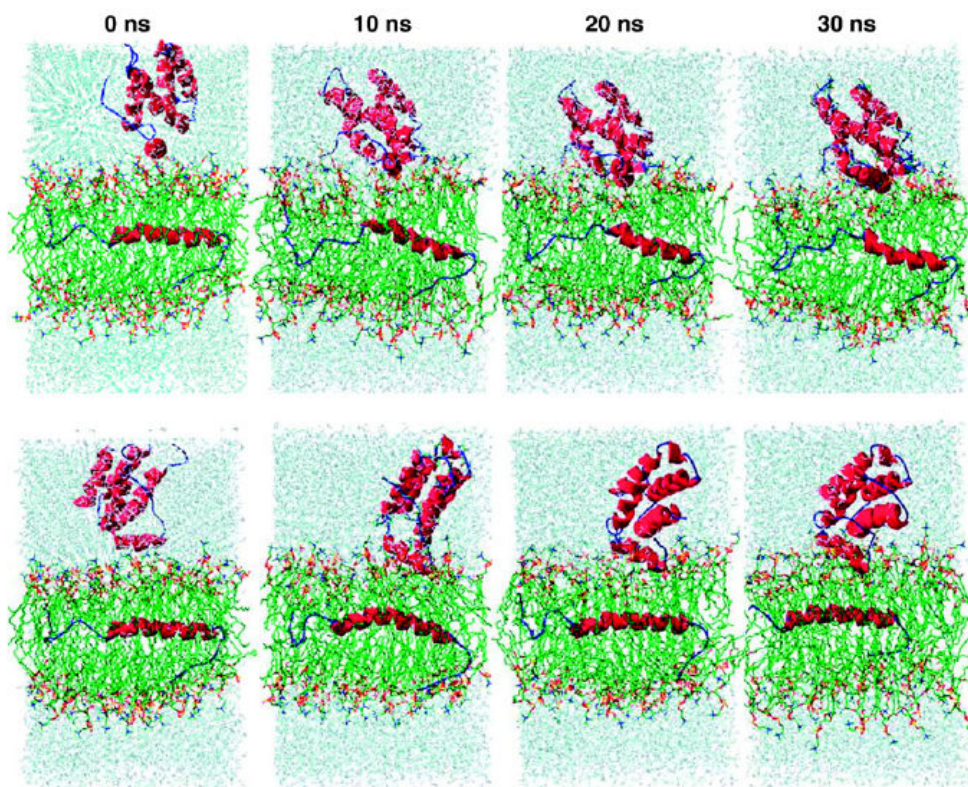


Figure 9 : simulations moléculaires dynamiques de la carnobactériocine Cbn B2 et de sa protéine d'immunité ImB2 dans un environnement mimant la membrane cytoplasmique (Soliman *et al.*, 2007)

La structure de la protéine d'immunité PisI a été déterminée par résonance magnétique nucléaire (Martin-Visscher *et al.*, 2008a). Cette protéine de 98 acides aminés a une structure

globulaire en milieu aqueux et présente quatre hélices α anti-parallèles. Comparativement aux protéines d'immunité déjà connues (ImB2 et EntA-im), PisI est plus grande et possède une partie N-terminale plus flexible et une partie C-terminale plus courte. Dans cette étude, aucune interaction directe entre la protéine d'immunité PisI et sa bactériocine (piscicoline 126) n'a été mise en évidence.

Le mécanisme de l'immunité contre la lactococcine A mettrait en jeu un récepteur indispensable pour l'activité de cette bactériocine. La protéine d'immunité LciA interagirait avec ce récepteur et inhiberait ainsi l'action toxique de la lactococcine (Venema *et al.*, 1994).

Dans certains cas, les protéines d'immunité n'interagissent pas directement avec leur bactériocine mais probablement *via* un récepteur de cette dernière (Dalet *et al.*, 2000 ; Ennahar *et al.*, 2000b ; Ramnath *et al.*, 2000 ; Dalet *et al.*, 2001). Cependant, le mécanisme de l'immunité est loin d'être interprété dans sa globalité. Une étude comparative des protéines d'immunité des bactériocines de la sous-classe IIa a été réalisée (Fimland *et al.*, 2002a). La fonctionnalité de la protéine d'immunité est souche-dépendante. Certaines de ces protéines expriment une forte spécificité d'immunité tandis que d'autres permettent une immunité croisée contre d'autres bactériocines de la sous-classe IIa. Ces résultats suggèrent également que le degré d'interaction, direct ou indirect, entre la protéine d'immunité et la bactériocine dépend de la partie C-terminale du peptide, or c'est cette partie qui serait responsable de la spécificité de la bactériocine (Fimland *et al.*, 1996). Tous ces résultats contradictoires tendent à prouver la grande complexité du mécanisme d'immunité ; ce dernier serait variable en fonction de la souche productrice et du couple bactériocine/protéine d'immunité mis en jeu.

III. Les bactériocines de la sous-classe IIa

III.1 Structure

Ce sont des peptides de petite taille contenant de 37 à 48 résidus d'acides aminés. Toutes les bactériocines de la sous-classe IIa sont chargées positivement à pH physiologique (pI compris entre 8 et 11), hydrophobes et thermostables. Ces peptides ne sont sujet à aucune modification post-traductionnelle (Nes *et al.*, 2000). Les bactériocines de la sous-classe IIa montrent une activité anti-*Listeria* et possèdent une séquence consensus « YGNGV » dans la région N-terminale.

Généralement, deux parties bien distinctes peuvent être distinguées au sein de la structure primaire des bactériocines de la sous-classe IIa. La partie N-terminale s'étend du premier résidu d'acide aminé jusqu'au résidu 18 à 20, juste avant le tryptophane qui est

relativement bien conservé. La partie C-terminale s'étend du tryptophane, précédemment cité, jusqu'au dernier résidu de la chaîne polypeptidique (Figure 10). Ces deux régions jouent un rôle différent dans le mécanisme d'action de la bactériocine.

Mésentéricine Y105	-----KYYGNGVHCTKSGCSVNWGEAASAG----IHLR LANGGN-GFW-----	37
Leucocine A	-----KYYGNGVHCTKSGCSVNWGEAFSAG----VHRLANGGN-GFW-----	37
Leucocine C	-----KNYGNGVHCTKKGCSVDWGYAWTNIANN SVMNGLTGGNAGWHN-----	43
Mundticine	-----KYYGNGVSCNKKGCSVDWGKAIIGIIGNNSAANLATGGAAGWKS-----	43
Mundticine KS	-----KYYGNGVSCNKKGCSVDWGKAIIGIIGNNSAANLATGGAAGWKS-----	43
Sakacine P	-----KYYGNGVHCTKYSCTVDWGTAIIGNIIGNNAAANWATGGNAGWKN-----	43
Curvacine A	-----ARSYNGVYCNKKCWVNRGEATQSIIGGMTSGWASGLA-GM-----	41
Piscicoline 126	-----KYYGNGVSCNKNKCTVDWSKAIIGIIGNNAAANLTTGGAAGWNGK-----	44
Carnobactériocine BM1	-----AISYNGVYCNKKECWVNRKAENKQAITGIVIGGWASSLA-GMGH-----	43
Carnobactériocine B2	-----VNYGNGVSCSKTKCSVNWGOAFQERYTAGINSFVSGVASGAGSIGRRP	48
Bavaricine-MN	-----TKYYGNGVYCNKKCWVDWGOAAGGIIGQTVVXGWLGGAI PGK-----	42
Entéroccine P	-----ATRSYNGVYCNNSK CWVNWGEAKENIAGIVISGWASGLA-GMGH-----	44
Sakacine G	-----KYYGNGVSCNSHGCSVNWGOAWTCG----VNHLANGGH-GVC-----	37
Pédiocine PA-1	-----KYYGNGVTCGRHSCSVDWGRATTCIINNGAMAXATGGHQGNHXX----	44
Entéroccine A	TTHSGKYYGNGVYCTKNKCTVDWAKATTCIAGMSTGGFLGGAI PGK-----	47
Divercine V41	-----TKYYGNGVYCNKKCWVDWGOASGCIIGQTVVGGWLGGAIPGK-----	43
Plantaricine 423	-----KYYGNGVTCGRHSCSVDWGOAFSCS----VSHLANFGH-GKC-----	37
Listeriocine 743	-----KSYGNGVQCNKKCWVDWGSATSTIGNNSAANWATGGAAGWKS-----	43
Sakacine 5X	-----KYYGNGVLSNKKSGCSVDWSKAISIIIGNNAVANLTTGGAAGWKS-----	43
Lactococcine MMFII	-----TSYNGVHCKNSKCIWIDVSELETYK----AGTVSNPKDILW-----	42

Figure 10 : alignement de séquences de différentes bactériocines de la sous-classe IIa

L'alignement est réalisé avec le moteur ClustalW ; les zones noires correspondent aux identités et les zones grises aux similarités.

Elles présentent toutes au moins un pont disulfure dans la région N-terminale entre deux résidus cystéine conservés (Jack *et al.*, 1995 ; Ennahar *et al.*, 2000b ; Drider *et al.*, 2006).

Les études structurales (dichroïsme circulaire et RMN) des bactériocines de la sous-classe IIa ont montré que ces peptides sont totalement déstructurés en milieu polaire. Ces bactériocines adoptent leur conformation spatiale uniquement dans un environnement mimant des membranes (trifluoroéthanol ou micelles de dipalmitoylcholine). Une étude menée sur différentes bactériocines de la sous-classe IIa a montré qu'une hélice α oblique serait présente du résidu 15 (voire 16) jusqu'au résidu 27 (voire 28). La capacité des bactériocines de la sous-classe IIa de passer d'une conformation déstructurée en milieu polaire à une conformation présentant une hélice au voisinage de la membrane cytoplasmique est indispensable à leur activité (Bhugaloo-Vial *et al.*, 1996 ; Fimland *et al.*, 1996 ; Ennahar *et al.*, 2000b). Cette conformation permettrait l'insertion de la bactériocine dans la bicouche lipidique afin d'y former des pores.

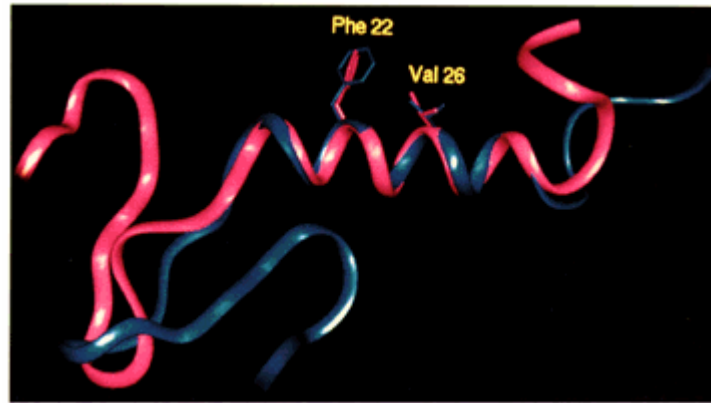


Figure 11: superposition de la structure en hélice α de la leucocine A

A sa plus basse énergie dans 90 % de trifluoroéthanol (en bleu) et en présence de micelles de dipalmitoylcholine (en rose) (Fregeau Gallagher *et al.*, 1997).

La leucocine A (Figure 11) présente au niveau de la séquence consensus YGNGV un tour β ainsi qu'une structure en feuillet β stabilisée par la formation d'une boucle β liée à la formation d'un pont disulfure entre les résidus cystéines aux positions 9 et 14. De plus, la majeure partie des résidus de la région C-terminale est impliquée dans la formation d'une hélice α amphiphile.

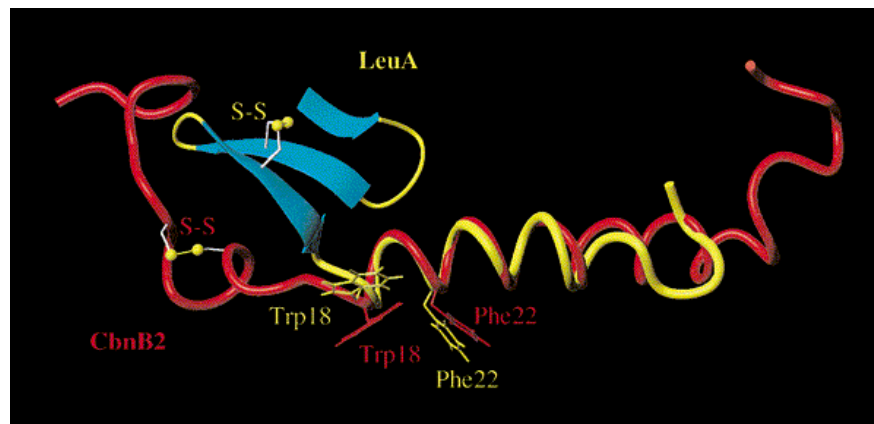


Figure 12 : superposition du tryptophane 18 et de la phénylalanine 22 de la carnobactériocine Cbn B2 (rouge) et de la leucocine A (jaune)

(Wang *et al.*, 1999)

Trois autres structures de bactériocines de la sous-classe IIa sont connues, celle de la carnobactériocine Cbn B2 (Figure 12) (Wang *et al.*, 1999 ; Sprules *et al.*, 2004a), de la sakacine P (Uteng *et al.*, 2003) et de la curvacine A (Haugen *et al.*, 2005).

La carnobactériocine B2 présente au niveau de sa région C-terminale une hélice α superposable avec celle de la leucocine A (Wang *et al.*, 1999). Il n'y a pas de structure particulière dans la région N-terminale. Ces motifs structuraux sont retrouvés dans les

prédictions établies pour la pédiocine PA-1 (Chen *et al.*, 1997b). La sakacine P montre dans sa région N-terminale une conformation en forme de S, formée par trois feuillets β anti-parallèles (Uteng *et al.*, 2003). Cette conformation est également observée dans la curvacine A, où le feuillet β est stabilisé, en plus du pont disulfure, par des liaisons hydrogène (Haugen *et al.*, 2005). En revanche, la carnobactériocine B2 ne semble pas adopter de structure particulière dans cette région mis à part la présence d'un pont disulfure (Wang *et al.*, 1999).

Les structures tridimensionnelles établies pour la leucocine A (Fregeau Gallagher *et al.*, 1997), la carnobactériocine Cbn B2 (Wang *et al.*, 1999), la sakacine P (Uteng *et al.*, 2003) et la curvacine A (Haugen *et al.*, 2005) montrent dans la région C-terminale la présence d'une hélice α suivie d'une queue flexible.

Une étude de prédiction de structure sur neuf bactériocines suggère la présence d'une première partie centrale sous forme d'une hélice α oblique suivie d'une seconde hélice du même type dans la région C-terminale (Bennik *et al.*, 1998).

La présence de deux hélices est également prédite par d'autres auteurs avec les pisciocines VIa (piscicoline 126) et VIb (carnobactériocine Cbn BM1) (Bhugaloo-Vial *et al.*, 1996) et la curvacine A (Haugen *et al.*, 2005).

III.2 Rôle des différentes régions de la bactériocine

L'étude des relations entre structure et fonction des bactériocines de la sous-classe IIa est fondée sur des comparaisons de structures primaires et des prédictions de structures secondaires. Les spectres d'activité sont étudiés dans le but d'identifier les régions du peptide jouant un rôle dans la reconnaissance de la souche cible et/ou dans l'activité antimicrobienne propre à la bactériocine. Toutes les parties de la molécule ainsi que l'intégrité de la séquence en résidus d'acides aminés (notamment le ou les tryptophane(s)) semblent jouer un rôle important soit dans la reconnaissance de la souche cible, soit dans l'activité antibactérienne du peptide. En effet, des bactériocines mutées ou tronquées présentent le plus souvent une activité antibactérienne réduite voire inexistante (Fimland *et al.*, 1996 ; Quadri *et al.*, 1997 ; Miller *et al.*, 1998a ; Fimland *et al.*, 2002b ; Fimland *et al.*, 2006).

Les motifs en hélice α seraient indispensables à l'activité antibactérienne des bactériocines. D'autres éléments structuraux semblent importants dans l'activité de ces peptides comme la présence d'un deuxième pont disulfure, de résidus d'acides aminés chargés positivement et de résidus tryptophane. De plus en plus d'études sont menées afin

d'identifier les motifs structuraux directement impliqués dans l'activité antibactérienne de ces peptides (Fimland *et al.*, 1996 ; Quadri *et al.*, 1997 ; Miller *et al.*, 1998a).

- La région N-terminale

Plusieurs éléments de la région N-terminale ont été proposés comme jouant un rôle important dans l'activité de la bactériocine, notamment la séquence consensus « YGNGV », le feuillet β , les charges positives et le pont disulfure.

1) Le motif « YGNGV »

Le motif « YGNGV », très conservé dans toutes les bactériocines appartenant à la sous-classe IIa, serait intégré dans une structure en feuillet β (Chen *et al.*, 1997b ; Fregeau Gallagher *et al.*, 1997 ; Watson *et al.*, 2001). Ce motif a longtemps été considéré comme la partie responsable de l'activité anti-*Listeria* chez les bactériocines de la sous-classe IIa en raison de son ubiquité. En effet, toutes modifications ou délétions dans cette séquence consensus entraînent une diminution importante voire une perte totale de l'activité vis-à-vis du genre *Listeria* (Fleury *et al.*, 1996 ; Quadri *et al.*, 1997 ; Miller *et al.*, 1998a ; Miller *et al.*, 1998b). Cependant, des bactériocines de la sous-classe IIa présentent des altérations dans cette séquence comme l'acidocine A (Kanatani *et al.*, 1995), la bactériocine 31 (Tomita *et al.*, 1996) ou la pisciocine CS526 (Suzuki *et al.*, 2005), tout en conservant une activité anti-*Listeria*. Cette observation remet donc en cause l'implication du consensus « YGNGV » dans la reconnaissance du genre *Listeria*.

2) Le feuillet β

Deux fonctions ont été proposées pour le feuillet β .

La première fonction serait d'exposer le motif consensus « YGNGV » lors du contact avec la membrane cytoplasmique et de permettre une bonne reconnaissance par un éventuel récepteur spécifique, pour un positionnement correct de la bactériocine permettant à son activité de s'exprimer (Fleury *et al.*, 1996 ; Fregeau Gallagher *et al.*, 1997). Cependant, de nombreux travaux ont contesté le rôle de ce motif dans la spécificité du peptide. Cette séquence interviendrait dans la première étape de fixation à la membrane en stabilisant la structure en feuillet β intervenant dans l'adsorption à la membrane de cellule cible (Fimland *et al.*, 1996 ; Chen *et al.*, 1997a ; Chen *et al.*, 1997b). Cette structure en feuillet β favoriserait la formation d'un bloc de résidus d'acides aminés chargés positivement pour permettre

l'adsorption *via* des interactions électrostatiques sur les phospholipides membranaires, au niveau des têtes polaires chargées négativement (Chen *et al.*, 1997a ; Chen *et al.*, 1997b).

La deuxième fonction de cette structure β serait la formation d'un bloc hydrophobe facilitant ultérieurement l'insertion de la bactériocine au sein de la bicouche lipidique (Chen *et al.*, 1997b).

3) Les ponts disulfure

La présence du pont disulfure ne semble pas obligatoire pour l'activité de ces peptides biocides (Quadri *et al.*, 1994 ; Eijsink *et al.*, 1998 ; Simon *et al.*, 2002). Une disparition de ces ponts entraîne, en général, une baisse modérée de l'activité antimicrobienne, ce qui indiquerait un rôle non essentiel de cette structure (Hastings *et al.*, 1991 ; Quadri *et al.*, 1994 ; Eijsink *et al.*, 1998). Des résultats différents ont été obtenus avec la mésentéricine Y105 pour laquelle la disparition du pont disulfure (blocage des thiols ou mutagenèse) entraîne une perte importante de son activité (Fleury *et al.*, 1996). Ce résultat entre en contradiction avec l'activité quasi intacte obtenue avec la mésentéricine Y105 réduite (Simon *et al.*, 2002). Il est fort probable que le pont disulfure permette de conserver une structuration en feuillet β servant à faciliter le contact avec la membrane *via* des interactions électrostatiques. Cependant, en l'absence du pont disulfure, il est possible que les bactériocines soient capables d'adopter une conformation favorisant les « patchs » positifs au voisinage de la membrane cytoplasmique.

L'activité des bactériocines serait corrélée avec le nombre de ponts disulfure présents dans leur structure (Richard *et al.*, 2006). Pour les bactériocines présentant quatre résidus cystéines, il semblerait que la présence d'un pont disulfure, formé entre les deux résidus C-terminaux, soit indispensable à l'activité (Eijsink *et al.*, 1998 ; Bhugaloo-Vial *et al.*, 1999). Ce pont aiderait à la stabilité de la structure en feuillet β , même en milieu polaire, puisque les prédictions de structure effectuées sur la pédiocine PA-1 prévoient le même pourcentage de structure β dans un milieu polaire que dans un milieu apolaire (Watson *et al.*, 2001). Les peptides possédant un pont disulfure supplémentaire présentent un spectre plus large que les peptides ayant un seul pont disulfure (Jack *et al.*, 1995 ; Eijsink *et al.*, 1998). L'introduction d'un second pont disulfure dans la sakacine P entraîne un élargissement de son spectre d'activité alors que la suppression du second pont disulfure de la pédiocine PA-1 provoque une réduction de son spectre (Fimland *et al.*, 2000). Une étude portant sur différentes bactériocines, deux ayant un seul pont disulfure (sakacine P et curvacine A) et deux ayant

deux ponts disulfures (pédiocine PA-1 et entéroisine A), a montré que l'existence du second pont augmente l'activité anti-*Listeria* des bactériocines (Eijsink *et al.*, 1998 ; Guyonnet *et al.*, 2000). La disparition de ce pont disulfure, par réduction des cystéines ou par mutagenèse dirigée, entraîne une diminution importante voire une perte totale de l'activité antimicrobienne de la pédiocine PA-1 (Chikindas *et al.*, 1993 ; Eijsink *et al.*, 1998 ; Miller *et al.*, 1998b), de l'entéroisine A (Eijsink *et al.*, 1998) et de la sakacine G (Simon *et al.*, 2002). Une corrélation peut donc être établie entre spectre/niveau d'activité et présence d'un second pont disulfure dans la structure des bactériocines de la sous-classe IIa (Eijsink *et al.*, 1998).

Il a été suggéré que le deuxième pont disulfure, comme celui placé dans la région N-terminale, permettrait la formation d'un bloc de charges positives favorisant l'adsorption sur les phospholipides négatifs de la membrane bactérienne (Chen *et al.*, 1997a ; Miller *et al.*, 1998b). Ce second bloc faciliterait donc cette étape d'adsorption et par conséquent l'activité de la bactériocine. Cependant, bien que la sakacine G possède un deuxième pont disulfure, elle présente une activité très proche de celle de la mésentéricine Y105 qui n'en possède qu'un seul (Simon *et al.*, 2002).

- La région C-terminale

Des travaux sur la partie C-terminale de bactériocines de la sous-classe IIa ont montré un rôle décisif dans la spécificité du spectre d'action et ce malgré une grande variabilité dans cette région (Fimland *et al.*, 1996) contrairement à la région N-terminale qui est relativement conservée (Figure 10).

Tout comme la région N-terminale, la région C-terminale interviendrait, *via* des interactions électrostatiques, dans l'ancrage préliminaire de la bactériocine sur la membrane de la cellule cible. De nombreux auteurs ont émis l'hypothèse que ce serait la partie C-terminale en hélice α et non la partie N-terminale et sa séquence « anti-*Listeria* » qui serait responsable de la spécificité de la cible (Bhugaloo-Vial *et al.*, 1996 ; Fimland *et al.*, 1996). Des hybrides de bactériocines ont été synthétisés (Fimland *et al.*, 1996). Ces hybrides consistent en la ligation de la région N-terminale provenant d'une bactériocine avec la région C-terminale provenant d'une autre bactériocine. Dans tous les cas, le spectre d'activité est identique à celui de la bactériocine dont la partie C-terminale est originaire. De plus, un fragment composé de 15 résidus, correspondant à la région C-terminale de la pédiocine PA-1, diminue l'activité de cette bactériocine lorsqu'il est ajouté à la culture contenant cette dernière. Ce phénomène d'inhibition est dû probablement à l'occupation d'un site spécifique présent sur la membrane de la cellule cible par le fragment empêchant ainsi l'adsorption de la

pédiocine PA-1 (Fimland *et al.*, 1998). Enfin, ce même fragment de 15 résidus est capable d'inhiber, dans une moindre mesure, l'activité de l'entéroïcine A. Cette bactériocine présente une partie de séquence identique avec la pédiocine PA-1 (Fimland *et al.*, 1998). Des analogues de la pédiocine PA-1, ayant de légères modifications de séquence, présentent des différences dans le spectre d'activité par rapport à la bactériocine originelle (Miller *et al.*, 1998a ; Johnsen *et al.*, 2000).

1) L'hélice α

L'hélice α serait capable, du fait de son orientation, de s'insérer dans l'interface hydrophile/hydrophobe de la membrane. Cette orientation oblique perturberait la membrane et faciliterait la pénétration de la bactériocine dans la bicouche lipidique (Bennik *et al.*, 1998). Les études sur les structures hélicoïdales de la région C-terminale permettent de mieux comprendre l'insertion du peptide dans la membrane mais pas la spécificité de ce dernier (Fimland *et al.*, 1996).

2) Les acides aminés aromatiques

Les acides aminés aromatiques, notamment le tryptophane, semblent très importants pour l'activité des bactériocines, en particulier lorsqu'ils sont placés dans la région C-terminale.

Pour la grande majorité des bactériocines de la sous-classe IIa (87 % des cas), un résidu tryptophane est présent au début de la région C-terminale. Un autre résidu tryptophane se trouve soit à la fin soit au milieu de l'hélice α de la région C-terminale (83 % des cas). Pour les bactériocines qui ne présentent qu'un seul tryptophane, 50 % d'entre-elles ont une phénylalanine à la place du deuxième tryptophane. La phénylalanine est un acide aminé aromatique qui possède un fort encombrement stérique.

Une substitution du tryptophane central par un autre résidu entraîne une chute de l'activité antimicrobienne pour la pédiocine PA-1 (Miller *et al.*, 1998b) ou pour la mésentéricine Y105 (Fleury *et al.*, 1996). Ces deux résidus aromatiques pénètrent dans la partie hydrophobe de la membrane lipidique lors de l'ancrage de ces deux bactériocines (Bhugalo-Vial *et al.*, 1999 ; Castano *et al.*, 2005). Les résidus tryptophane perturberaient la membrane et permettraient ainsi l'insertion de l'hélice α C-terminale. Toute substitution de l'un ou l'autre des deux résidus tryptophane de la sakacine P, présumés encadrer l'hélice α amphiphile, provoque une perte importante d'activité. La substitution la moins délétère est

celle effectuée avec une phénylalanine (Fimland *et al.*, 2002b). Les effets de ces substitutions sont partiellement atténués voire complètement annulés par la création d'un second pont disulfure. Les deux résidus tryptophane interviendraient dans la stabilisation d'une structure en épingle à cheveux permettant le rapprochement de ces deux résidus dans l'espace (Fimland *et al.*, 2002b). Le second pont disulfure trouvé chez certaines bactériocines anti-*Listeria* jouerait le même rôle (Fimland *et al.*, 2002b). Ces résultats montrent l'importance de la présence de ces deux résidus aromatiques à l'interface milieu extracellulaire/membrane.

III.3 Spectre d'activité

Les bactériocines des bactéries lactiques exercent leur activité létale uniquement sur les bactéries à Gram positif en provoquant ou non leur lyse cellulaire. Le spectre d'activité est généralement plus large que celui des colicines produites principalement par des souches d'*Escherichia coli* (Cascales *et al.*, 2007) ou des microcines produites essentiellement par la famille des *Enterobacteriaceae* (Duquesne *et al.*, 2007).

Le spectre d'activité des bactériocines de la sous-classe IIa est variable. Il est plus ou moins large mais touche essentiellement des bactéries phylogénétiquement proches de la souche productrice. Dans tous les cas, le genre *Listeria* est inhibé. Il comprend également des bactéries lactiques et d'autres bactéries à Gram positif, en particulier des espèces pathogènes ou indésirables comme *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* sp., *Bacillus* sp. et *Micrococcus* sp. Pour exemple, les spectres d'activité des carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2, ainsi que celui de la mésentéroïcine 52A sont présentés dans les tableaux 4 et 5.

Les bactériocines des autres classes sont généralement connues pour posséder un spectre d'activité étroit, limité à la même espèce ou à des bactéries phylogénétiquement proches de la souche productrice. L'inhibition du genre *Listeria* n'est pas exclusive aux bactériocines de la sous-classe IIa. En effet, certains peptides ont un spectre d'inhibition large avec une forte activité antagoniste envers le genre *Listeria*, sans toutefois posséder la séquence consensus « YGNGV » dans leur région N-terminale, telles que la thermophiline (Marciset *et al.*, 1997), l'entéroïcine B (Casaus *et al.*, 1997), la curvaticine FS47 (Garver *et al.*, 1994) ou la divergicine 750 (Holck *et al.*, 1996).

Des bactériocines ayant des séquences proches peuvent présenter des spectres d'action différents (Morency *et al.*, 2001) ce qui laisse supposer une grande spécificité d'action ou de

résistance. De plus, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) varient considérablement d'une espèce bactérienne à l'autre et même entre souches appartenant à une même espèce (Meghrous *et al.*, 1999 ; Ennahar *et al.*, 2000a). Il est à noter que les spectres d'inhibition des bactériocines sont le plus souvent établis à partir de surnageants de cultures ou de préparations semi-purifiées. Ce résultat est donc représentatif de l'activité antibactérienne globale d'une souche et non de l'activité d'une seule bactériocine. C'est pour cette raison que lorsqu'une souche produit plusieurs bactériocines, l'interprétation du spectre d'inhibition est seulement possible si celui-ci est réalisé à partir de bactériocines purifiées ou synthétisées chimiquement. De plus, l'activité antibactérienne de la bactériocine est conditionnée par des facteurs physico-chimiques du milieu qui peuvent alors modifier le seuil de sensibilité des souches et ainsi aboutir à des spectres d'activité erronés.

Tableau 4 : activités antibactériennes de la mésentéroïne 52A (Mes 52A)

Souches cibles	Désignation	Zone d'inhibition (diamètre en mm)
<i>Carnobacterium divergens</i>	DSM 20623	++
	DSM 20624	+++
<i>C. piscicola</i>	DSM 20730	+++
<i>Enterococcus durans</i>	LMA 630	++
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	DSM 20079 ^T	0
<i>Lb. büchneri</i>	DSM 20057 ^T	0
<i>Lb. brevis</i>	DSM 20054 ^T	0
<i>Lb. casei</i>	DSM 20011 ^T	0
<i>Lb. curvatus</i>	LMA SB 13	+
	DSM 20019	++
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	DSM 20081 ^T	0
<i>Lb. fermentum</i>	DSM 20052 ^T	0
<i>Lb. helveticus</i>	DSM 20075 ^T	0
<i>Lb. plantarum</i>	DSM 20174 ^T	0
<i>Lb. sakei</i>	DSM 20017 ^T	+++
<i>Leuconostoc citreum</i>	CIP 103405	0
<i>Ln. lactis</i>	DSM 20202	+
	LMA 28	+
<i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	INRA 361	++
	DSM 20200	++
<i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	LMA 190	+++
	LMA 18G	+
	LMA J24	++
	DSM 20484	++
<i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	CIP 5417	+++
	LMA 7	+++
	LMA 2	+++
	LMA 33	++
	DSM 20240	++
	DSM 20243	++
	CIP 103316 ^T	+++
	CIP 6818	+++
<i>L. ivanovii</i>	LMA 1	+++
<i>L. monocytogenes</i>	CIP 82110	++
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	LMA 532	++
<i>Weissella confusa</i>	CIP 103172 ^T	0
<i>W. halotolerans</i>	CIP 103005 ^T	0
<i>W. minor</i>	CIP 102978 ^T	0
<i>W. paramesenteroides</i>	LMA 19	+++
	LMA 39	++
	DSM 20288	0
	LMA KI	++
	LMA 133	++
<i>W. viridescens</i>	CIP 102810 ^T	0

0, pas d'inhibition ; +, < 2 mm ; ++, entre 3 et 8 mm ; +++, > 9 mm. (Revol-Junelles *et al.*, 1996b ; Krier *et al.*, 1998 ; Limonet *et al.*, 2004b).

Tableau 5 : activités antibactériennes des carnobactériocines BM1 (Cbn BM1) et B2 (Cbn B2)

Souches testées	Désignation	Inhibition		Références
		Cbn BM1	Cbn B2	
<i>Bacillus cereus</i>	ENITIAA 8	-	N.D	Bhugaloo-Vial <i>et al.</i> , 1996
<i>Carnobacterium divergens</i>	LV 13	+	+	Quadri <i>et al.</i> , 1994
	NCDO 2763	+	N.D	Bhugaloo-Vial <i>et al.</i> , 1996
	ENITIAA V41	+	N.D	Bhugaloo-Vial <i>et al.</i> , 1996
<i>C. maltaromaticum</i>	UAL26	+	+	Quadri <i>et al.</i> , 1994
<i>Clostridium perfringens</i>	NCTC 8798	-	N.D	Bhugaloo-Vial <i>et al.</i> , 1996
<i>Cl. sporogenes</i>	IPP 3679	-	N.D	Bhugaloo-Vial <i>et al.</i> , 1996
<i>Cl. tyrobutyricum</i>	ATCC 25755	-	N.D	Bhugaloo-Vial <i>et al.</i> , 1996
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433	+	+	Quadri <i>et al.</i> , 1994
	ENITIAA 24	+	N.D	Bhugaloo-Vial <i>et al.</i> , 1996
<i>E. faecium</i>	ATCC 11576	+	+	Quadri <i>et al.</i> , 1994
	ATCC 19434	+	+	Quadri <i>et al.</i> , 1994
<i>Lactobacillus curvatus</i>	INRA Theix 674	+	N.D	Bhugaloo-Vial <i>et al.</i> , 1996
<i>Lb. plantarum</i>	ATCC 4008	+	+	Quadri <i>et al.</i> , 1994
	ATCC 14917	+	N.D	Bhugaloo-Vial <i>et al.</i> , 1996
<i>Lb. sakei</i>	INRA Theix 110	+	N.D	Bhugaloo-Vial <i>et al.</i> , 1996
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	INRA CNRZ 117	-	N.D	Bhugaloo-Vial <i>et al.</i> , 1996
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ATCC 8293	+	N.D	Bhugaloo-Vial <i>et al.</i> , 1996
<i>Listeria innocua</i>	ATCC 33090	+	+	Quadri <i>et al.</i> , 1994
	F ENITIAA 15	+	N.D	Bhugaloo-Vial <i>et al.</i> , 1996
	ATCC 15313	+	+	Quadri <i>et al.</i> , 1994
<i>L. monocytogenes</i>	LI0502	N.D	+	Sprules <i>et al.</i> , 2004a
	O57	N.D	+	Nilsson <i>et al.</i> , 2002
	Scott A DSV	+	N.D	Bhugaloo-Vial <i>et al.</i> , 1996
<i>Pediococcus acidilactici</i>	INRA Theix 716	+	N.D	Bhugaloo-Vial <i>et al.</i> , 1996
<i>P. parvulus</i>	ATCC 19371	+	+	Quadri <i>et al.</i> , 1994
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Gram -)	ENITIAA 7	-	N.D	Bhugaloo-Vial <i>et al.</i> , 1996
<i>Staphylococcus aureus</i>	ENITIAA 2	-	N.D	Bhugaloo-Vial <i>et al.</i> , 1996

+ : présence d'une zone d'inhibition ; - : pas de zone d'activité ; N.D : non déterminé

IV. Mode et mécanismes d'action

IV.1 Quantification de l'activité antibactérienne

IV.1.1 Détermination du titre en bactériocine

Le dosage des bactériocines présente plusieurs difficultés : (i) la quantité de peptides (mg.mL^{-1}) n'est proportionnelle à son activité que dans les mêmes conditions opératoires (pH, sels...); ainsi la majorité des auteurs expriment la quantité de bactériocines en activité antimicrobienne vis-à-vis d'une souche cible (Unité Arbitraire. mL^{-1} ou UA. mL^{-1}) plutôt qu'en concentration massique ou molaire ; (ii) les bactériocines sont produites dans des milieux complexes ce qui rend leur dosage par chromatographie (HPLC) difficile, une purification préalable étant nécessaire.

Plusieurs méthodes de dosage ont été proposées au cours de ces dernières années telles que l'utilisation de la conductance (Giraffa *et al.*, 1990), de l'immunofluorescence (Bouksaim *et al.*, 1998) ou du dosage du potassium (Mugochi *et al.*, 2001).

Cependant la méthode la plus utilisée reste celle dite des dilutions critiques (Mayr-Hasting *et al.*, 1972). Celle-ci consiste à déterminer, contre une souche cible pré-établie, l'activité antibactérienne de dilutions successives au demi de l'échantillon à tester ; il existe deux méthodes pour déterminer l'activité, l'une en milieu solide et l'autre en milieu liquide.

La première méthode en plaques de gélose, plus couramment utilisée, consiste à doser l'activité antibactérienne contre une souche cible en milieu gélosé par dépôt de l'échantillon dans des puits (Shahani *et al.*, 1976 ; Schillinger *et al.*, 1989) ou en gouttes à la surface (Fleming *et al.*, 1975). Le titre de l'activité antibactérienne, exprimé en UA. mL^{-1} , est défini comme l'inverse de la dernière dilution donnant une zone d'inhibition du tapis bactérien. Des droites de régression peuvent ensuite être construites à partir de ces résultats en mettant en relation les diamètres des zones d'inhibition de l'échantillon non dilué avec les logarithmes des titres de l'activité antibactérienne vis-à-vis d'une souche cible. Les droites obtenues, $\log [\text{bactériocines}] \text{ en UA.mL}^{-1} = f(\text{diamètre}) \text{ en mm}$, permettent de quantifier rapidement l'activité antibactérienne d'une suspension.

La seconde méthode en milieu liquide (Daba *et al.*, 1991) consiste à doser l'activité antibactérienne contre une souche cible par mélange d'une suspension de cette souche cible et de l'échantillon à tester en cuves ou en microplaques. Le titre de l'activité antibactérienne est défini comme la quantité nécessaire donnant une inhibition de 50 % du micro-organisme cible par rapport à un témoin ensemencé dans les mêmes conditions, mais sans bactériocine.

La comparaison de ces deux méthodes, avec quatre bactériocines différentes, a permis de montrer que bien que la méthode en milieu liquide soit plus reproductible, la possibilité d'établir des droites étalons à partir des diamètres d'inhibition obtenus en milieu gélosé est plus pratique pour doser de nombreux échantillons (Parente *et al.*, 1995). De plus, la détermination d'une activité de type bactériocine en milieu gélosé, par utilisation d'une droite d'étalonnage, est plus précise et plus rapide que le dosage en milieu gélosé en utilisant la méthode des dilutions critiques (Nunez *et al.*, 1996).

IV.1.2 Facteurs physico-chimiques influençant l'activité des bactériocines

Certains facteurs physico-chimiques peuvent modifier l'activité antibactérienne par action sur la diffusion du peptide (en milieu solide) ou sur l'activité de la bactériocine (Tableau 6).

Les spectres d'inhibition sont, dans la plupart des cas, réalisés sur milieu solide par la méthode dite d'antibiogramme. Cependant l'activité antibactérienne est limitée par la diffusion des bactériocines. Certains auteurs ont mis en évidence plusieurs facteurs influençant cette diffusion : la concentration en agar dans les milieux de détection est souvent diminuée pour permettre une meilleure diffusion ; ainsi de 15 g.L⁻¹ initialement (Kaiser *et al.*, 1993 ; Vignolo *et al.*, 1995), elle est de 7 g.L⁻¹ (Arihara *et al.*, 1996), voire de 6 g.L⁻¹ (Coventry *et al.*, 1996a). La durée de diffusion à 4 °C joue également un rôle important bien que non généralisable. Elle peut être d'une heure (Joosten *et al.*, 1996), de 2 h (Parente *et al.*, 1992), de 6 h (Huot *et al.*, 1996), d'une nuit (Kaiser *et al.*, 1993), de 18 h (Baker *et al.*, 1996) ou être nulle (Vignolo *et al.*, 1995 ; Arihara *et al.*, 1996). Le Tween 80 est aussi parfois ajouté au milieu gélosé (0,1 %, v/v) afin d'accroître la diffusion de l'agent antibactérien (Joosten *et al.*, 1996). L'influence de cinq facteurs (pH, inoculum, NaCl, agar et huile de soja) sur la diffusion de quatre bactériocines (sakacine A, sakacine B, pédiocine PA-1 et piscicoline 61) a été mesurée (Blom *et al.*, 1997). Il s'est avéré que les réponses étaient bactériocines-dépendantes. De plus, dans ce cas, il est délicat de définir si c'est la diffusion ou l'activité de la bactériocine qui est modifiée. D'une manière générale, tous les éléments capables d'adsorber ou d'agréger les bactériocines diminuent leur diffusion et donc leur efficacité.

Tableau 6 : effets de composés chimiques sur l'activité des bactériocines

Bactériocines	Facteurs		Références
	Favorables	Défavorables	
Bifidocine B	pH	pH, NH ₄ Cl, MgCl ₂ , KCl, KI, TRIS-HCl	Yildirim <i>et al.</i> , 1999
Bovicine HC5	MgCl ₂ , CaCl ₂	pH	Houlihan <i>et al.</i> , 2004 Houlihan <i>et al.</i> , 2006
Curvacine A	pH, EDTA, NaCl, propyl-parabène	pH, lécithine, caséine, X ²⁺	Ganzle <i>et al.</i> , 1999
Nisine A/Z	pH, EDTA, NaCl, propyl-parabène, maltol, EGTA, maltol éthylique, citrate, phosphate, activité de l'eau (aw)	pH, lécithine, caséine, MgSO ₄ , MgCl ₂ , CaCl ₂ , MnSO ₄ , BaCl ₂	Ganzle <i>et al.</i> , 1999 Dielbandhosing <i>et al.</i> , 1998 Crandall <i>et al.</i> , 1998 Schved <i>et al.</i> , 1996 Cutter <i>et al.</i> , 1995b Cutter <i>et al.</i> , 1995a Houlihan <i>et al.</i> , 2004 Houlihan <i>et al.</i> , 2006 Cerrutti <i>et al.</i> , 2001
Pédiocine PA-1/AcH	pH	DTT, pH, NaCl, KCl, NH ₄ Cl, MgCl ₂ , TRIS-HCl, phosphate	Chikindas <i>et al.</i> , 1993 Bhunja <i>et al.</i> , 1991
Sakacine P	pH, EDTA, NaCl, propyl-parabène	pH, lécithine, caséine, X ²⁺	Ganzle <i>et al.</i> , 1999

X²⁺ : cations divalents, DTT : dithiothréitol, EDTA : acide éthylènediamine-tétra-acétique, EGTA : acide éthylène glycol-bis (2-aminoéthylether)-*N,N,N',N'*-tétra-acétique, TRIS : 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol

Le pH joue un rôle important dans l'activité des bactériocines de plusieurs manières. Il modifie la solubilité de la bactériocine : la nisine est quasi insoluble à pH neutre ou alcalin. De plus, le pH modifie la stabilité de la bactériocine, notamment lors d'un choc thermique (Liu *et al.*, 1990). Enfin, l'activité antibactérienne des « *pediocin-like* » est augmentée à une valeur de pH acide (inférieure ou égale à 5,0) comparativement à celle observée à pH 7,0 (Chen *et al.*, 1997a ; Chen *et al.*, 1997b). En revanche, la bavaricine MN présente une activité optimale à un pH de 6,0 (Kaiser *et al.*, 1993). D'une manière générale, les bactériocines de bactéries lactiques possèdent de nombreux résidus d'acides aminés chargés sur lesquels le pH du milieu peut avoir une grande incidence. Ceci explique les différences d'activité observées en fonction de l'acidité.

Différents facteurs modifient l'activité antibactérienne des bactériocines (Tableau 6). Il est cependant délicat de différencier les substances qui agissent sur la bactériocine de celles qui interviennent sur la cellule cible. Il est cependant possible de déterminer plusieurs classes de molécules.

Les cations divalents (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} et Ba^{2+}) réduisent l'activité des bactériocines. L'hypothèse avancée pour expliquer ce phénomène est que ces cations s'associeraient à la paroi et à la membrane cytoplasmique anionique par des interactions électrostatiques et empêcheraient ainsi la progression des bactériocines à travers la paroi, voire l'adsorption sur la membrane cytoplasmique (Crandall *et al.*, 1998).

Les chélateurs comme le maltol, le maltol éthylique, le citrate, l'EDTA ou l'EGTA déstabilisent la paroi et la membrane des bactéries cibles et facilitent ainsi l'action des bactériocines. L'utilisation de telles molécules ou de stress thermiques, avec des bactériocines de bactéries lactiques, permet une action sur des bactéries à Gram négatif ainsi que sur des cellules eucaryotes comme les levures (Kalchayanand *et al.*, 1992 ; Cutter *et al.*, 1995a ; Dielbandhoesing *et al.*, 1998).

IV.2 Mode d'action

Le mode d'action des bactériocines est leur effet «macroscopique » sur une population de bactéries cibles. Il est généralement admis que les bactériocines produites par des bactéries lactiques agissent sur les cellules cibles en deux temps : adsorption de la bactériocine sur la surface cellulaire suivie d'un effet létal (Tagg *et al.*, 1976 ; Bhunia *et al.*, 1991). Après leur adsorption sur les bactéries sensibles, les bactériocines comme les antibiotiques peuvent avoir trois types d'effets : (i) un effet bactériostatique, c'est-à-dire un ralentissement ou un arrêt de la croissance, sans mortalité cellulaire. Une reprise de croissance peut être observée dans certains cas après un certain temps de contact entre les bactéries et la bactériocine ; (ii) un effet bactéricide ; une mort cellulaire est observée mais les bactéries gardent leur intégrité physique, car il n'y a pas de lyse ; (iii) un effet bactériolytique ; la mort des bactéries est principalement due à leur lyse.

L'effet observé pour une bactériocine donnée dépend souvent des conditions expérimentales, comme la concentration et la pureté du peptide, la souche cible, la population cellulaire initiale ainsi que le milieu de culture. L'état physiologique des bactéries cibles joue également un rôle très important dans ce type d'étude (Barrena-Gonzalez *et al.*, 1996 ; Martinez-Cuesta *et al.*, 1997).

L'effet combiné de bactériocines a été peu étudié. Cependant, des effets synergiques ont été reportés entre la pédiocine AcH et la nisine (Hanlin *et al.*, 1993), entre la curvaticine 13 et la nisine (Bouttefroy *et al.*, 2000), entre la lactocine 705, l'entérocin CRL35 et la nisine (Vignolo *et al.*, 2000). Une synergie d'action a également été mise en évidence entre des

bactériocines à deux composants telles que les plantaricines JK et EF (Moll *et al.*, 1999b). Une étude de combinaisons de bactériocines de la classe I (nisine) et de la classe II (pédiocine AcH, lacticine 481, lactacine F et lactacine B) sur le genre *Listeria* a été réalisée (Mulet-Powell *et al.*, 1998). Les résultats de cette étude ont montré un effet synergique entre toutes les bactériocines, sauf avec la lacticine 481, et les trois autres peptides où un effet antagoniste a été obtenu. Enfin peu d'études ont mis en évidence des synergies d'action entre des bactériocines produites par une même souche mis à part entre les entérocinines A et B produites par *Enterococcus faecium* T136 (Casaus *et al.*, 1997) et entre les mésentérocinines 52A et 52B produites par *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* FR52 (Limonet *et al.*, 2004b). Dans ce dernier cas, les synergies d'action ont été étudiées en déterminant la fraction de concentration inhibitrice (FIC, *fractional inhibitory concentration*). Cette technique permet de déterminer si l'ajout d'un peptide antibactérien exerce une action synergique (FIC <1), additionnelle (FIC = 1) ou antagoniste (FIC >1) sur l'activité d'une autre bactériocine (Hall *et al.*, 1983).

IV.3 Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action des bactériocines est très largement étudié. Il est admis qu'il se décompose en trois étapes. La première consiste en la fixation du peptide sur la membrane de la cellule cible. C'est durant cette étape que le peptide adopte sa conformation tridimensionnelle permettant l'expression de son activité. La seconde étape est l'insertion de la bactériocine dans la membrane cytoplasmique. Durant cette étape, plusieurs peptides antibactériens sont recrutés pour former un pore. La dernière étape est la formation du pore. Ce dernier conduit à des fuites de composés intracellulaires vitaux. Leur perte entraîne donc des effets néfastes pour la cellule, allant d'un simple ralentissement de la vitesse de croissance bactérienne à la mort cellulaire.

IV.3.1 Adsorption et structuration de la bactériocine

La fixation de la bactériocine sur la cellule cible constitue la première étape du mécanisme d'action du peptide antibactérien. Cette interaction est de nature électrostatique (Chen *et al.*, 1997a) car le peptide est cationique et la membrane anionique. Des paramètres du milieu, comme le pH, peuvent jouer sur l'étape d'adsorption en modifiant les charges du peptide. La bactériocine en milieu polaire (aqueux) est totalement déstructurée (Fregeau Gallagher *et al.*, 1997 ; Wang *et al.*, 1999 ; Watson *et al.*, 2001 ; Sanchez-Barrena *et al.*, 2003

; Haugen *et al.*, 2005). Après l'adsorption, le peptide se structure généralement en feuillet β anti-parallèle dans la région N-terminale et en hélice α dans la région C-terminale. La spécificité d'action des bactériocines se situerait lors de cette première étape. Plusieurs hypothèses ont été formulées :

(i) il existerait un récepteur protéique qui serait responsable de la première interaction avec la cellule cible (Eijsink *et al.*, 1998). Ce récepteur permettrait la spécificité du peptide et faciliterait la formation du pore en augmentant la micro-concentration en bactériocine dans un espace donné. Cette hypothèse provient d'une extrapolation du mécanisme d'action de peptides antimicrobiens autres que les bactériocines produites par des bactéries lactiques. Cependant, pour les bactériocines de la sous-classe IIa, ce récepteur protéique serait une mannose perméase (Robichon *et al.*, 1997 ; Dalet *et al.*, 2000 ; Gravesen *et al.*, 2000 ; Ramnath *et al.*, 2000 ; Dalet *et al.*, 2001 ; Héchard *et al.*, 2001 ; Gravesen *et al.*, 2002b ; Arous *et al.*, 2004 ; Vadyvaloo *et al.*, 2004a ; Vadyvaloo *et al.*, 2004b ; Xue *et al.*, 2005 ; Calvez *et al.*, 2007 ; Diep *et al.*, 2007) ou un autre type de protéine membranaire (Duffes *et al.*, 2000). Il est à noter que ces deux hypothèses ne sont en aucune manière exclusives et qu'il est possible que la spécificité d'action et l'activité soient dues à plusieurs de ces phénomènes. L'existence d'un récepteur a été mise en évidence grâce à un inhibiteur compétitif consistant en un fragment de bactériocine non active (Fimland *et al.*, 1996). Cette saturation de l'activité, due *a priori* à une compétition de fixation, met en avant l'hypothèse d'un récepteur spécifique. De plus, l'utilisation d'énantiomère(s) de la leucocine A ne présentant pas d'activité confirme cette hypothèse, bien qu'à concentration élevée en bactériocine, une activité non dépendante de la chiralité de la molécule ait été observée (Yan *et al.*, 2000). Ces résultats ne peuvent pas être généralisés. Plusieurs auteurs ont montré *in vitro* que la présence d'une protéine membranaire n'était pas indispensable pour l'activité de la pédiocine PA-1 (Chen *et al.*, 1997a ; Chen *et al.*, 1998), de la bavaricine MN (Kaiser *et al.*, 1996), de la mésentéricine Y105 (Castano *et al.*, 2005), de la plantaricine A (Zhao *et al.*, 2006) et de la nisine (Sahl *et al.*, 1987 ; Garcera *et al.*, 1993 ; Martin *et al.*, 1996 ; Winkowski *et al.*, 1996 ; Breukink *et al.*, 1997 ; Brotz *et al.*, 1998 ; van Kraaij *et al.*, 1998 ; Moll *et al.*, 1999a) ;

(ii) il existerait un récepteur lipidique, comprenant 25 têtes de phospholipides (Chen *et al.*, 1997b), qui serait spécifique des bactériocines. Dans ce cas, la spécificité serait due à la composition de la membrane en phospholipides. Concernant les lantibiotiques de la classe I, comme la nisine ou la mésarcidine, l'interaction du peptide avec le lipide II a été démontrée (Brotz *et al.*, 1998 ; Wiedemann *et al.*, 2001 ; Hsu *et al.*, 2002 ; van Heusden *et al.*, 2002 ;

Breukink *et al.*, 2003 ; Hsu *et al.*, 2003 ; Hasper *et al.*, 2004 ; Wiedemann *et al.*, 2004 ; Christ *et al.*, 2007).

La composition de la membrane en phospholipides joue un rôle important sur l'activité des bactériocines et notamment sur leur fixation, leur structuration et leur pénétration (Papo *et al.*, 2003). En effet, la présence de phospholipides anioniques ou zwitterioniques dans la membrane facilite l'adsorption de la bactériocine, ce qui augmente son activité. Ceci a été démontré pour la mésentéroïne 52A (Limonet *et al.*, 2002 ; Limonet *et al.*, 2004a), la pédiocine PA-1 (Chen *et al.*, 1998 ; Naghmouchi *et al.*, 2007), le peptide AS-48 (Abriouel *et al.*, 2001), la divergicine M35 (Naghmouchi *et al.*, 2006 ; Naghmouchi *et al.*, 2007), la mundticine KS (Sakayori *et al.*, 2003), la plantaricine (Zhao *et al.*, 2006) et la nisine (Demel *et al.*, 1996 ; Martin *et al.*, 1996 ; Van Den Hooven *et al.*, 1996 ; Breukink *et al.*, 1997 ; van Kraaij *et al.*, 1998 ; Kramer *et al.*, 2006).

IV.3.2 Insertion de la bactériocine et formation de pores dans la cellule cible

Du fait de sa situation intermédiaire dans le mécanisme d'action, l'insertion du peptide est une étape difficile à isoler, donc à étudier. Plusieurs travaux ont cependant permis d'aboutir à certaines conclusions :

(i) l'activité des bactériocines est souvent dépendante de la force protomotrice, comme c'est le cas pour la pédiocine PA-1 dépendante des $\Delta\Psi$ et ΔpH (Bruno *et al.*, 1993 ; Chen *et al.*, 1997b), la subtiline (Schuller *et al.*, 1989), le peptide Pep5 (Kordel *et al.*, 1988), la plantaricine C (Gonzalez *et al.*, 1996) et la nisine (Gao *et al.*, 1991 ; Bruno *et al.*, 1993 ; Winkowski *et al.*, 1996 ; van Kraaij *et al.*, 1998). La force protomotrice ne semble pas indispensable dans d'autres cas, comme pour l'acidocine 8912 (Tahara *et al.*, 1996), la lacticine F (Abee *et al.*, 1994) ou la lactococcine B (Venema *et al.*, 1993) ;

(ii) la fluorescence d'un résidu tryptophane situé à l'extrémité de la région C-terminale, a permis de montrer que la nisine, la pédiocine PA-1 et la mésentéroïne Y105 pénètrent dans la membrane cytoplasmique (Martin *et al.*, 1996 ; Chen *et al.*, 1998 ; Fimland *et al.*, 2002b ; Castano *et al.*, 2005). La fluorescence de deux résidus tryptophane (W18 et W33) au sein d'une même bactériocine, la pédiocine PA-1, indique que l'un des résidus s'insère en profondeur dans la membrane et que l'autre reste en surface (Chen *et al.*, 1998). Dans le cas de la mésentéroïne Y105, la bactériocine ne s'insère que partiellement dans un liposome (Castano *et al.*, 2005). Il a été montré, par méthode enzymatique et par synthèse de liposome, que la partie C-terminale de la nisine traverse la membrane pour être en contact avec le milieu intracellulaire (van Kraaij *et al.*, 1998) ;

(iii) la formation de pores dans la membrane n'est pas due à l'action d'un peptide seul. Il existe donc un regroupement de bactériocines dans la membrane afin de permettre la formation d'un pore (Huang 2006).

Trois modèles ont été établis, notamment pour la nisine : le modèle « *Barrel-stave* » ou en douves de tonneau (Abee 1995 ; Bechinger 1999 ; Shai 1999 ; Brogden 2005) et le modèle « *Carpet* » ou en tapis formant un pore de type « *Toroidal* » ou coin de serrage (Bechinger 1999 ; Moll *et al.*, 1999a ; Shai 1999 ; Brogden 2005) décliné en modèle « *Wormhole* » ou trou de ver pour les bactéries à Gram négatif (Bechinger 1999 ; Shai 1999 ; Brogden 2005) (Figure 13).

Le premier modèle « *Barrel-stave* » (Figure 13, partie A) décrit la formation de pores ou de canaux transmembranaires dans la membrane par assemblage des hélices α . Cette organisation se déroule de telle sorte que les parties hydrophobes des peptides interagissent avec la partie apolaire de la membrane et que leurs parties hydrophiles soient orientées vers l'extérieur pour former un pore aqueux. Ce mécanisme peut se décomposer en quatre étapes (Shai 1999) : (i) les bactériocines cationiques s'adsorbent sur les têtes de phospholipides chargées négativement et se structurent en hélices α ; (ii) les bactériocines se reconnaissent entre elles et s'auto-assemblent ; (iii) les structures hélicoïdales hydrophobes s'insèrent dans la membrane et forment un pore ; (iv) de nouvelles molécules de bactériocines sont recrutées progressivement pour augmenter la taille du pore.

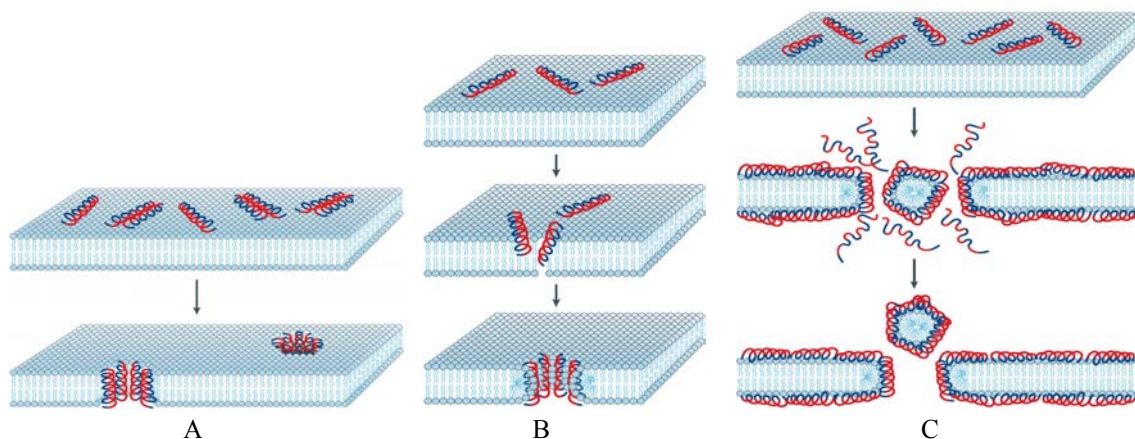


Figure 13 : modèles des mécanismes d'action des bactériocines

A : « *Barrel-stave* » ; B : « *Toroidal* » ; C : « *Wormhole* ». (Brogden 2005)

Le deuxième modèle « *Carpet* » (Figure 13, parties B et C) décrit un mécanisme d'action où les molécules de bactériocines sont toujours en contact avec les têtes de phospholipides durant la perméabilisation de la membrane. Selon ce modèle, les peptides

s'adsorbent sur la membrane de la cellule cible et la recouvrent pour former un tapis. La formation de pores se déroule uniquement si les bactériocines sont présentes localement en grande quantité. Dans ce cas, l'action des bactériocines est possible si la membrane de la cellule cible est complètement recouverte par des peptides ou si des micro-tapis de bactériocines se forment localement sur la bicouche lipidique. Dans le modèle « *Carpet* », contrairement au modèle « *Barrel-stave* », les molécules de bactériocines ne s'insèrent pas dans le feuillet hydrophobe de la membrane et elles n'interagissent pas entre elles au niveau de leur partie hydrophile. De ce fait, un peptide qui obéit à ce modèle ne doit pas nécessairement adopter une structure spécifique pour pouvoir interagir avec la membrane car les interactions entre cette dernière et les bactériocines sont électrostatiques. Le mécanisme peut se décomposer en quatre étapes (Shai 1999) : (i) les bactériocines cationiques s'adsorbent sur les têtes de phospholipides chargées négativement ; (ii) les bactériocines s'alignent sur la surface de la membrane pour que leur partie hydrophile soit en contact avec la partie polaire des phospholipides ou avec des molécules d'eau à l'interface ; (iii) la rotation des peptides conduit à la réorientation des résidus hydrophobes vers la partie apolaire de la membrane. La quatrième étape peut aboutir à la formation d'un pore adoptant une structure « *Toroidal* » (Figure 13, partie B) ou bien la courbure de la membrane provoquée par la réorientation des bactériocines aboutit à une désintégration de la membrane suivant le modèle « *Wormhole* » (Figure 13, partie C). Cette dernière option est probablement rencontrée lors de l'action des peptides antibactériens sur des bactéries à Gram négatif. En effet, les pores formés permettent le passage des bactériocines à travers la membrane externe pour qu'elles puissent agir sur la membrane cytoplasmique *via* le même mécanisme (Shai 1999 ; Brogden 2005).

IV.3.3 Les conséquences de la présence de pores

Les conséquences immédiates de la formation de pores sont des fuites de composés intracellulaires aboutissant à une dépolarisation de la membrane cytoplasmique, à un dysfonctionnement enzymatique, puis à la mort cellulaire. Le Tableau 7 résume les conséquences physiologiques dues à l'action de diverses bactériocines. Les fuites, ainsi que les conséquences qu'elles entraînent, peuvent être classées en plusieurs groupes :

(i) fuites de composants intervenant dans la création de la force protomotrice. Les fuites d'ions, et particulièrement de protons et de potassium, impliquent une modification de la force protomotrice (FPM) ou au moins de l'un de ces composants selon la nature de la fuite. Cette diminution de la FPM a pour conséquence un dysfonctionnement de certaines enzymes

membranaires FPM-dépendantes. C'est le cas du système phosphotransférase (PTS) sous l'action de la pédiocine JD (Christensen *et al.*, 1992 ; Waite *et al.*, 1998a), de la leucocine S (Waite *et al.*, 1998a) et de la nisine (Waite *et al.*, 1998a), du transport actif de certains acides aminés tels que le glutamate, la lysine et la leucine sous l'action de la mésentéricine Y105 (Maftah *et al.*, 1993) et de l'acidocine 8912 (Tahara *et al.*, 1996) ;

(ii) baisse de la concentration en ATP. Elle a été mentionnée lors de l'action de plusieurs bactériocines, comme la pédiocine PA-1, la pisciocine CS526, la nisine, la pédiocine JD, la leucocine S (Waite *et al.*, 1998a), la lactostrepcine et l'entérocoque P. Cependant, cette baisse peut être imputée dans certains cas à une fuite d'ATP (Zajdel *et al.*, 1985) ou comme c'est le cas avec la nisine, à une déficience en phosphate inorganique due à des fuites, ou à un dysfonctionnement de la synthèse d'ATP, en raison de la chute de la FPM ;

(iii) fuites de composés intracellulaires. Dans plusieurs cas, des fuites d'acides aminés et/ou d'intermédiaires de la glycolyse, comme le phosphoénolpyruvate, ont été détectées. Ce phénomène provoque un dysfonctionnement de l'organisme cellulaire par carence en métabolites indispensables se traduisant par une diminution voire un arrêt des synthèses (ADN, ARN, protéines, lipides, polysaccharides).

La spécificité des pores vis-à-vis de certains composés a également été étudiée et particulièrement chez les souches produisant deux bactériocines. Ainsi, il s'est avéré qu'il existe une complémentarité de fuites dues aux bactériocines. En effet, les plantaricines EF et JK (sous-classe IIb) provoquent respectivement des fuites d'anions et de cations (Moll *et al.*, 1999b).

IV.3.4 Méthodes pour l'étude du mécanisme d'action

L'étude du mécanisme d'action des bactériocines est délicate, car il est très rarement possible de dissocier les trois étapes (adsorption, insertion et formation de pores). En effet, si l'un des facteurs du système est modifié (bactériocine, milieu ou cellule cible), il est difficilement possible de déterminer sur quelle(s) étape(s) ce changement intervient. Cependant plusieurs hypothèses ont été émises et ont été partiellement vérifiées.

Plusieurs méthodes ont été mises au point pour étudier au mieux le mécanisme d'action des bactériocines :

(i) l'activité des bactériocines, déterminée par la méthode de l'antibiogramme, reste une méthode très imprécise qui reflète davantage le mode que le mécanisme d'action ;

(ii) la détermination des variations de la force protomotrice ($\Delta\Psi$ et ΔpH) est réalisée par des méthodes de marquage radioactif (Ruhr *et al.*, 1985 ; Sahl *et al.*, 1987 ; Bruno *et al.*, 1993

; Chikindas *et al.*, 1993 ; Venema *et al.*, 1993 ; Abee *et al.*, 1994 ; Kaiser *et al.*, 1996 ; Tahara *et al.*, 1996 ; Crandall *et al.*, 1998) ou grâce à des sondes fluorescentes (BCECF-AM pour le ΔpH et DiSC₃[5] pour le $\Delta \Psi$) (Gao *et al.*, 1991 ; Molenaar *et al.*, 1991 ; Venema *et al.*, 1996 ; Bennik *et al.*, 1997 ; Verheul *et al.*, 1997 ; Herranz *et al.*, 2001a ; Suzuki *et al.*, 2005), éventuellement couplées à la cytométrie en flux (Maftah *et al.*, 1993). Cette méthode permet de quantifier l'activité antibactérienne de manière précise ainsi que ses conséquences sur la viabilité cellulaire ;

Tableau 7 : conséquences cellulaires dues à l'action de peptides antibactériens

Bactériocines	Effets	Références
Acidocine 8912	Perturbation du potentiel transmembranaire Fuite d'isobutyrate et de glutamate	Tahara <i>et al.</i> , 1996
Auréocine 53	Arrêt de l'incorporation de molécules marquées (glucose, glutamate, thymidine) Arrêt de la synthèse des protéines, de l'ADN et des polysaccharides. Perturbation du potentiel transmembranaire Fuite de potassium Fuite de carboxyfluorescéine sur liposomes chargés négativement	Netz <i>et al.</i> , 2002
Bavaricine MN	Perturbation du potentiel transmembranaire Fuite de carboxyfluorescéine	Kaiser <i>et al.</i> , 1996
Entéroicine P	Diminution du potentiel de membrane Pas d'effet sur la force motrice (légère augmentation ATPase ?) Disparition de l'ATP, pas de fuite mais hydrolyse Fuite de carboxyfluorescéine sur liposome Fuite de potassium Pas de perturbation de la capture du phosphate ni fuite de phosphate Accumulation intracellulaire de glutamate mais pas de fuite : pas de perturbation de la capture du glutamate	Herranz <i>et al.</i> , 2001a ; Herranz <i>et al.</i> , 2001b
Lactostrepcine 5	Bloque la synthèse de l'ADN et des protéines Diminution de la transcription de l'ARN Inhibition de la capture de l'uridine Diminution de la concentration en ATP intracellulaire et fuite d'ATP Fuite de potassium	Zajdel <i>et al.</i> , 1985
Mésentéricine Y105	Perturbation du potentiel transmembranaire Fuite d'isobutyrate, de glutamate, de leucine et de lysine	Maftah <i>et al.</i> , 1993
Nisine	Fuite d'ATP, d'ADP, d'AMP, de phosphoénolpyruvate, de carboxyfluorescéine, de phosphate, de calcéine, de lysine, de potassium et de glutamate Perturbation du potentiel transmembranaire	Ruhr <i>et al.</i> , 1985 ; Stevens <i>et al.</i> , 1992 ; Garcera <i>et al.</i> , 1993 ; Abee <i>et al.</i> , 1994 ; Davies <i>et al.</i> , 1994 ; Winkowski <i>et al.</i> , 1994 ; Winkowski <i>et al.</i> , 1996 ; Bennik <i>et al.</i> , 1997 ; Breukink <i>et al.</i> , 1997 ; Waite <i>et al.</i> , 1998a ; Waite <i>et al.</i> , 1998b
Pédiocine PA-1	Perturbation du potentiel transmembranaire Fuite de carboxyfluorescéine, de phosphate, de potassium, d'isobutyrate et de glutamate Baisse de la concentration en ATP	Chikindas <i>et al.</i> , 1993 ; Chen <i>et al.</i> , 1995 ; Chen <i>et al.</i> , 1997b
Pédiocine JD	Perturbation du potentiel transmembranaire Fuite de protons Baisse de la concentration en ATP	Christensen <i>et al.</i> , 1992
Piscicocine CS526	Fuite de potassium Hydrolyse de l'ATP intracellulaire Perturbation du potentiel transmembranaire	Suzuki <i>et al.</i> , 2005
Plantaricine A	Dissipation du potentiel de membrane Fuite de potassium	Kristiansen <i>et al.</i> , 2005

(iii) l'utilisation de la fluorescence des résidus tryptophane présents dans la séquence primaire de certaines bactériocines. Le « *quenching* » de fluorescence observé lorsque ce type de résidu aromatique est présent dans une membrane permet de visualiser l'insertion de la bactériocine dans la bicouche lipidique (Chen *et al.*, 1998 ; Castano *et al.*, 2005). Cette technique permet d'observer les deux premières étapes du mécanisme d'action ;

(iv) les dosages des fuites de carboxyfluorescéine de liposomes artificiellement chargés (Chikindas *et al.*, 1993 ; Kaiser *et al.*, 1996 ; Winkowski *et al.*, 1996 ; Chen *et al.*, 1997b ; Herranz *et al.*, 2001a ; Netz *et al.*, 2002), d'ATP et de phosphate inorganique (Abee *et al.*, 1994 ; Bennik *et al.*, 1997 ; Montville *et al.*, 1999 ; Pantev *et al.*, 2003 ; Aucher *et al.*, 2004 ; Vadyvaloo *et al.*, 2004b ; Li *et al.*, 2005 ; Suzuki *et al.*, 2005), de potassium (Abee *et al.*, 1994 ; Davies *et al.*, 1994 ; Herranz *et al.*, 2001b ; Fimland *et al.*, 2005 ; Suzuki *et al.*, 2005 ; Todorov *et al.*, 2005), de composés organiques, comme le glucose, le phosphoénolpyruvate, le glutamate, la lysine, la proline, la leucine et l'isobutyrate, par marquage radioactif (Ruhr *et al.*, 1985 ; Kordel *et al.*, 1986 ; Chikindas *et al.*, 1993 ; Maftah *et al.*, 1993 ; Venema *et al.*, 1993 ; Tahara *et al.*, 1996 ; Venema *et al.*, 1996 ; Brotz *et al.*, 1998 ; Waite *et al.*, 1998a ; Waite *et al.*, 1998b) sont des méthodes fréquemment utilisées. De même que les variations de la force protomotrice, ces méthodes quantifient les fuites de composés intracellulaires dues à la formation de pores ;

(v) la quantification de la chute d'activité des protéines membranaires permet de visualiser les conséquences des fuites à plus long terme. Celles responsables de l'acheminement des nutriments dans la cellule sont étudiées en utilisant des composés marqués ou fluorescents. Le système PTS et certaines enzymes responsables du transport de certains acides aminés ont été particulièrement étudiés (Kordel *et al.*, 1986 ; Venema *et al.*, 1993 ; Gonzalez *et al.*, 1996 ; Waite *et al.*, 1998a ; Waite *et al.*, 1998b).

Ces méthodes analytiques sont appliquées sur un couple peptide/cible. Le peptide est le plus souvent une bactériocine qui peut être modifiée chimiquement ou génétiquement (mutagenèse dirigée). La cible est une cellule bactérienne sensible, un protoplaste, ou une construction artificielle telle que les liposomes ou des membranes planes ;

(vi) la pénétration du peptide dans la membrane de la cellule cible peut être déterminée par mesure de l'anisotropie de fluorescence d'une sonde extramoléculaire apolaire (Li *et al.*, 2002 ; Zhao *et al.*, 2006). L'étude de l'anisotropie de fluorescence d'une sonde fluorescente préalablement introduite dans la bicouche lipidique constitutive d'une biomembrane est une méthode de choix pour mesurer la fluidité de cette membrane (ou inversement sa

microviscosité) (Lentz *et al.*, 1989). La fluidité est assimilée à la plus ou moins grande amplitude des mouvements des chaînes d'acides gras des phospholipides. En effet, lorsqu'un fluorophore intégré dans la membrane est excité avec de la lumière linéairement polarisée, il émettra une lumière de fluorescence qui restera d'autant plus polarisée que ses mouvements sont restreints pendant la durée de vie de son état excité. Dans le cas considéré, le mouvement de la sonde est restreint par la présence des chaînes d'acides gras, autrement dit le mouvement de la sonde "épouse" celui des acides gras. Ceci est particulièrement confirmé dans le cas des sondes de forme linéaire comme le DPH ou le TMA-DPH. Le DPH est une molécule hydrophobe, elle s'insère donc au cœur de la bicouche lipidique. En effet, le DPH s'oriente principalement parallèlement aux chaînes d'acides gras. La fluorescence émise par la sonde reflète la compaction des chaînes d'acides gras dans la bicouche lipidique et par là, la fluidité au cœur de la membrane. Le TMA-DPH étant chargé positivement, il s'incorpore spécifiquement dans les lipides de la couche externe de l'enveloppe cellulaire (Kuhry *et al.*, 1983). Le TMA-DPH permet d'observer l'effet du peptide au niveau de la fluidité membranaire à la surface de la membrane cytoplasmique.

La fluidité des lipides membranaires peut, en première approche, être considérée comme inversement proportionnelle à l'anisotropie de fluorescence (Bokas *et al.*, 2007). L'anisotropie de fluorescence est reliée à la microviscosité du milieu et au temps de vie de fluorescence de la sonde. Si cette dernière est constante, alors l'anisotropie de fluorescence reflète la rigidité de la membrane. Pour résumer, l'anisotropie de fluorescence est une mesure de la mobilité rotatoire de la sonde.

Cette technique est applicable à toutes les bactériocines contrairement à la mesure de la fluorescence du tryptophane qui nécessite obligatoirement la présence de ce type de résidu aromatique dans la séquence du peptide.

La compréhension des mécanismes d'action des bactériocines peut également être abordée en étudiant les phénomènes liés à la résistance vis-à-vis de ces peptides antibactériens.

V. La résistance aux bactériocines

L'étude des souches résistantes permet de mieux appréhender le mécanisme d'action de ces peptides. C'est pour cette raison qu'elles ont été particulièrement étudiées par un grand nombre d'auteurs. De plus, il a été constaté l'apparition de résistance chez des souches initialement sensibles lorsqu'elles sont cultivées au contact de ces peptides. L'importance que

revêt l'acquisition de cette résistance, comme dans le cas pour des antibiotiques, a conduit à étudier les causes de ces résistances dites induites ou acquises.

Le terme de résistance est délicat à définir. Il est en effet inféodé à de nombreux paramètres ne dépendant ni de la bactériocine, ni de la souche cible, tels que la nature du milieu de culture (liquide ou solide), sa composition (Joosten *et al.*, 1996 ; Blom *et al.*, 1997 ; Galvin *et al.*, 1999), la température, l'état physiologique de la souche... Ainsi, les auteurs précisent-ils leur définition de la résistance en définissant un seuil de sensibilité à partir duquel la souche est considérée comme résistante. Afin de comparer la sensibilité de différentes souches vis-à-vis d'une même bactériocine, la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) est la technique la plus employée.

V.1 Les différents types de résistants

Il existe pour les bactériocines trois types de résistants : (i) les résistants naturels, c'est-à-dire les souches qui sont insensibles à une bactériocine donnée sans adaptation particulière, par exemple *Leuconostoc citreum* CIP 103405 est insensible à la mésentéroïne 52A (Limonet *et al.*, 2004a) ; (ii) les résistants induits, qui sont produits lorsqu'une souche naturellement sensible à une bactériocine présente un phénotype de résistance lié à une adaptation, comme c'est probablement le cas de *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* LMA 7AR vis-à-vis de la mésentéroïne 52A (Limonet *et al.*, 2002) ou à des mutations, comme chez *Lactococcus lactis* (Guinane *et al.*, 2007). Le taux de croissance des résistants induits cultivés en présence de bactériocine est identique à celui de la souche parentale (Reckhif *et al.*, 1994). En revanche, cultivés en absence de bactériocine, les résistants induits ont une phase de latence plus longue et un taux de croissance plus faible que celui de la souche sauvage (Ming *et al.*, 1993 ; Mazzotta *et al.*, 1997 ; Goulhen *et al.*, 1998 ; Duffes *et al.*, 2000) ; (iii) les souches dites immunisées, c'est-à-dire celles qui produisent une protéine d'immunité simultanément à une bactériocine, cas de toutes les bactéries productrices de peptides antibactériens.

Pour obtenir des résistants induits, des souches bactériennes naturellement sensibles sont soumises à un stress, à l'aide essentiellement de bactériocines. Deux méthodes sont généralement utilisées : la première consiste en des expositions successives de la souche sauvage à des concentrations croissantes en bactériocine (cette technique est réalisable aussi bien en milieu liquide que solide) (Maisnier-Patin *et al.*, 1996 ; Verheul *et al.*, 1997 ; Goulhen *et al.*, 1998 ; Limonet *et al.*, 2002). La deuxième méthode repose sur une exposition unique mais à une concentration élevée en bactériocine (Mazzotta *et al.*, 1997 ; Crandall *et al.*, 1998).

D'autres types de stress ont été utilisés comme l'adaptation à un pH non usuel (van Schaik *et al.*, 1999) ou à de basses températures, comme dans le cas de souches psychrotrophes (Abee *et al.*, 1994).

Des études avec *L. monocytogenes* rapportent des fréquences d'apparition de résistants induits vis-à-vis de la nisine de 10^{-5} à 10^{-8} et vis-à-vis de bactériocines de la sous-classe IIa de 10^{-3} à 10^{-6} selon les paramètres mis en œuvre lors des cultures (souches, bactériocines, température...) (Ming *et al.*, 1993 ; Reckhif *et al.*, 1994 ; Mazzotta *et al.*, 1997 ; Dykes *et al.*, 1998). Une étude plus récente sur la fréquence d'apparition de résistants de *L. monocytogenes*, à la pédiocine PA-1 ou à la nisine A, a été réalisée. Elle a montré une fréquence d'apparition de 10^{-6} en moyenne pour une résistance à la pédiocine PA-1 et une fréquence 10^{-2} à 10^{-7} pour la nisine A. Cette fréquence pour la résistance à la nisine A peut être diminuée à environ $5 \cdot 10^{-8}$ en présence de 6,5 % de NaCl ou à un pH de 5,5 ou après exposition à une température de 10 °C. Ces stress environnementaux n'ont pas d'influence sur la fréquence d'apparition des résistants à la pédiocine PA-1 (Gravesen *et al.*, 2002a). Des résistants à la lactacine 3147 (un lantibiotique) avec *Lc. lactis* IL1403 ont été obtenus à de très faibles fréquences d'apparition, de 10^{-8} à 10^{-9} (Guinane *et al.*, 2006).

L'obtention de mutants résistants à une bactériocine par mutagenèse dirigée est possible si la cible à muter est le récepteur de la bactériocine comme la mannose-perméase (Arous *et al.*, 2004 ; Calvez *et al.*, 2007 ; Diep *et al.*, 2007). Il est possible de sélectionner une souche résistante à une bactériocine à partir d'une banque de mutants obtenus par mutagenèse insertionnelle aléatoire. Des mutants de *Lc. lactis* IL1403 résistants aux lantibiotiques ont été obtenus à partir d'une banque réalisée par intégration du plasmide pORI19 (Guinane *et al.*, 2007). Il en est de même avec *L. innocua* résistant à la pédiocine AchH. Une banque de mutants a été créée en utilisant le transposon Tn917 (Xue *et al.*, 2005). L'avantage de ces techniques est qu'elles peuvent permettre l'identification de l'acteur responsable du phénotype de résistance, par conséquent le facteur de sensibilité peut parfois en être déduit.

Des repiquages successifs de résistants induits, avec ou sans pression de sélection, ont permis de montrer que le phénotype de résistance semble être stable. Ainsi, la résistance à la nisine de *L. monocytogenes* est conservée après 20 repiquages en absence du lantibiotique (Mazzotta *et al.*, 1997), ainsi que la résistance à la divercine V41 (Duffes *et al.*, 2000). De même, celle de *Pediococcus acidilactici* est stable après 60 repiquages en l'absence de bactériocine (Goulhen *et al.*, 1998). Concernant la résistance vis-à-vis de bactériocines de la sous-classe IIa, cette stabilité a également été mise en évidence (Reckhif *et al.*, 1994) ou non (Dykes *et al.*, 1998). Dans ce cas, des fréquences de réversion du phénotype de résistance en

phénotype sensible de 10^{-4} à 10^{-5} ont été mesurées. Une autre étude a montré que les résistants à la pédiocine PA-1 de *L. monocytogenes* sont beaucoup plus stables que ceux de la même souche à la nisine A (Gravesen *et al.*, 2002a).

Plusieurs études ont rapporté des phénomènes de résistance croisée chez *L. monocytogenes*. La résistance à la nisine induit une résistance à la pédiocine PA-1 et à la leucocine S (classe IV) (Crandall *et al.*, 1998) ; d'autres auteurs n'ont pas réussi à montrer une résistance croisée entre la nisine et la pédiocine PA-1 ou la bavaricine A (Rasch *et al.*, 1998), de même entre la nisine et la sakacine A ou l'entéroccine B (Schillinger *et al.*, 1998). En revanche pour la même espèce bactérienne, la résistance à la mésentéroccine 52A, à la curvaticine 13 ou à la plantaricine C19, entraîne une résistance croisée vis-à-vis des deux autres bactériocines mais pas vis-à-vis de la nisine (Reckhif *et al.*, 1994). Chez *L. innocua*, une résistance croisée a été observée entre la nisine et la pédiocine AcH ou l'entéroccine EFS2 (Song *et al.*, 1997). En 2000, Duffes *et al.* ont rapporté que la résistance à la divercine V41 entraîne une résistance aux pisciocines V1 et SF668 mais pas à la nisine. Une résistance croisée a été montrée chez *L. monocytogenes* O57 pour la nisine et pour des bactériocines de la sous-classe IIa (pédiocine PA-1, leucocine A et carnobactériocine B2) (Gravesen *et al.*, 2004). Chez *L. monocytogenes*, l'acquisition d'une résistance pour la nisine A ou la nisine Z permet de rendre la souche résistante à la pédiocine PA-1 et à la divergicine M35 (Naghmouchi *et al.*, 2007). Enfin, selon certains auteurs, la résistance à une bactériocine de la sous-classe IIa provoque une résistance aux autres bactériocines de cette même classe (Reckhif *et al.*, 1994 ; Wan *et al.*, 1997 ; Dykes *et al.*, 1998).

V.2 Les caractéristiques des résistants

Le support génétique de la résistance n'a pas encore été élucidé. Cependant chez *L. monocytogenes*, trois gènes *pbp2229*, *hpk1021* et *lmo2487*, codant respectivement une « *penicillin-binding* » protéine, une histidine kinase, et une protéine de fonction inconnue, ont été mis en évidence (Gravesen *et al.*, 2004). L'hypothèse d'une origine plasmidique est écartée (Ming *et al.*, 1993). L'hypothèse d'une similitude entre l'immunité naturelle de la souche productrice vis-à-vis de sa propre bactériocine et celle acquise par les souches résistantes est également écartée (Jack *et al.*, 1995). En outre, bien qu'il ait été mis en évidence la présence d'une nisinase chez *S. thermophilus*, *B. cereus* et *B. polymyxa* (Jarvis 1967), la vitesse de réaction de cette enzyme est inférieure à celle de l'action de la nisine. La résistance n'est donc pas due à cette protéase.

Actuellement, la compréhension du mécanisme de résistance porte sur les études de la membrane cytoplasmique. L'apparition d'un phénotype de résistance est très souvent liée à une modification des caractéristiques de la membrane. Le seul modèle concernant le mécanisme de résistance aux bactériocines a été proposé par Crandall et Montville en 1998 et concerne la nisino-résistance de *L. monocytogenes* ATCC 700302. Il implique plusieurs facteurs : (i) la modification du peptidoglycane et la présence de cations divalents gênant la progression des bactériocines vers la membrane cytoplasmique ; (ii) la modification de la charge électrique de la bicouche lipidique diminuant ainsi les interactions électrostatiques entre les bactériocines et la membrane ; (iii) la modification de la rigidité membranaire s'opposant à l'insertion des bactériocines dans la membrane. Cependant, en 1998, Goulhen *et al.* ont montré que la nisino-résistance de *L. monocytogenes* ne provenait pas de la non-adsorption de la bactériocine sur les cellules. L'hypothèse de la modification des protéines membranaires a également été formulée.

Les différences de composition en acides gras chez les résistants induits, par rapport à la souche parentale, sont soit non significatives soit contradictoires. Trois des quatre auteurs ayant travaillé avec la souche *L. monocytogenes* Scott A ne mettent pas en relation la résistance et la composition de la membrane en acide gras (Mazzotta *et al.*, 1997 ; Verheul *et al.*, 1997 ; van Schaik *et al.*, 1999). Un seul indique une diminution de la fluidité membranaire chez les variants résistants (Ming *et al.*, 1993). De plus, contrairement aux autres auteurs, Mazotta et Montville (1997) ont mis en évidence, chez les variants résistants cultivés en présence de nisine, une modification de la teneur en acides gras ayant pour conséquence une augmentation de la fluidité membranaire. Les autres travaux, réalisés avec des souches très différentes (Goulhen *et al.*, 1998 ; Chihib *et al.*, 1999 ; Mazzotta *et al.*, 1999) ne permettent pas de comparer les mécanismes de résistance. Cependant, d'une manière générale, la résistance à la nisine et/ou la présence de nisine modifie(nt) la composition membranaire en acides gras. Ceci tendrait à modifier la fluidité membranaire de la souche de manière à soit lui conférer une certaine résistance (*Clostridium botulinum*, *Pectinatus frisingensis*, *Pediococcus acidilactici*), soit à contrebalancer une modification de la fluidité membranaire, suite à la fixation de la nisine sur les membranes (*L. monocytogenes* Scott A).

Les résistants induits auraient une composition en phospholipides différente de celles de la souche parentale, avec une diminution des phospholipides totaux et des phospholipides anioniques (Ming *et al.*, 1995 ; Verheul *et al.*, 1997 ; Crandall *et al.*, 1998). Des variations dans les teneurs relatives en ces différents phospholipides pourraient modifier les interactions

entre la bactériocine cationique et la membrane cytoplasmique, ainsi que la structuration du peptide dans cet environnement différent. D'autre part, il a été montré que des nisino-résistants adsorbent moins de nisine que leur souche parentale (Ming *et al.*, 1995 ; Verheul *et al.*, 1997). De plus, la neutralisation des charges des phospholipides anioniques entraînerait leur condensation. Celle-ci provoquerait une plus grande rigidité membranaire qui s'opposerait à l'insertion des bactériocines dans la bicouche lipidique. Enfin, la modification de la composition en phospholipides serait constitutive (Crandall *et al.*, 1998). Cependant, certains auteurs ne notent pas de différence dans les teneurs en phospholipides entre les souches parentales et les résistants induits (Davies *et al.*, 1996). Les dernières études sur la résistance de *L. monocytogenes* à la leucocine A ont montré une augmentation du ratio en phosphatidylglycérol insaturé/saturé (Vadyvaloo *et al.*, 2002). Concernant la résistance des bactéries à Gram négatif à la nisine, une étude a montré que le taux de lipide II n'intervenait pas dans ce phénomène (Kramer *et al.*, 2004).

La structure et/ou la composition de la paroi cellulaire ont été mises en cause dans le phénotype de résistance. Plusieurs modifications ont en effet été rapportées chez les mutants induits. Les variants présentent généralement une résistance accrue au lysozyme (Maisnier-Patin *et al.*, 1996 ; Crandall *et al.*, 1998 ; Limonet *et al.*, 2004a), mais pas toujours (Verheul *et al.*, 1997). La résistance aux antibiotiques ciblant la paroi est augmentée (Maisnier-Patin *et al.*, 1996 ; Crandall *et al.*, 1998). L'hydrophobicité des cellules est modifiée (Ming *et al.*, 1995 ; Davies *et al.*, 1996 ; Maisnier-Patin *et al.*, 1996), ainsi que leur morphologie (Maisnier-Patin *et al.*, 1996). En effet, des observations de *Streptococcus thermophilus* INIA 463 résistant à la nisine, par microscopie électronique à transmission, montrent que cette dernière possède une paroi plus épaisse que la souche parentale (Garde *et al.*, 2004). Les acides téichoïques et lipotéichoïques peuvent également être impliqués dans le phénomène de résistance aux bactériocines (Davies *et al.*, 1996). En effet, la D-alanylation des acides téichoïques chez *S. pneumoniae* (Kovacs *et al.*, 2006) et des acides lipotéichoïques chez *Lc. lactis* (Kramer *et al.*, 2008) leur confèrent une résistance à la nisine.

Plusieurs auteurs ont étudié le rôle des protéines dans la résistance aux bactériocines, soit par une étude du protéome, soit par une approche génétique, soit par une étude des ARNm (Kramer *et al.*, 2006). Ainsi, chez *L. monocytogenes* l'implication du gène *rpoN* a été observée dans le phénomène de résistance (Robichon *et al.*, 1997 ; Dalet *et al.*, 2001). Ce gène code pour une protéine de 447 résidus d'acides aminés, semblable à la sous-unité σ^{54}

d'une ARN polymérase bactérienne de *B. subtilis*. Quand le facteur de transcription *rpoN* n'est pas exprimé chez la souche sensible, cette dernière devient résistante à la mésentéricine Y105. De plus, lorsque le gène codant ce facteur est interrompu chez *E. faecalis* JH2-2, la souche devient résistante à plusieurs bactériocines de la sous-classe IIa et reste sensible à la nisine (Dalet *et al.*, 2000 ; Héchard *et al.*, 2001). Chez un variant de *L. monocytogenes* résistant à la leucocine A, l'absence d'une protéine présentant 83 % d'identité avec une mannose phosphotransférase spécifique a été mentionnée (Ramnath *et al.*, 2000). Chez des résistants de *L. monocytogenes* à la pédiocine PA-1, une surexpression de plusieurs protéines, notamment de la β -glucoside PTS a été observée (Gravesen *et al.*, 2000). Des différences au niveau du protéome entre *L. monocytogenes* et de son variant nisino-résistant ont été observées par électrophorèse bidimensionnelle (Duffes *et al.*, 2000) ; ces différences consistent en la disparition de neuf protéines et en l'apparition de huit autres dont une flagelline et une ferritine. Ces auteurs émettent comme hypothèse qu'il ne semble pas y avoir de relation directe entre ces protéines et le phénotype de résistance, mais une dérégulation du système d'expression due peut-être au facteur sigma. La mannose perméase interviendrait dans la résistance face à plusieurs bactériocines de la sous-classe IIa chez *L. monocytogenes* (Gravesen *et al.*, 2002b ; Arous *et al.*, 2004 ; Vadyvaloo *et al.*, 2004b) et chez *L. innocua* (Xue *et al.*, 2005). Ces auteurs suggèrent que la mannose perméase serait le récepteur des bactériocines de la sous-classe IIa, mais cette hypothèse n'a pas été généralisée avec toutes les souches et toutes les bactériocines étudiées.

Certains peptides antibactériens ciblent un composé intracellulaire (Brogden 2005). Des résistants peuvent alors apparaître en modifiant cette cible cytoplasmique ; c'est le cas d'*E. coli* DH5 α résistant à la microcine J25 qui est mutée au niveau de l'ARN polymérase, cible du peptide (Yuzenkova *et al.*, 2002).

VI. La production et la purification des bactériocines

VI.1 Purification

La mise au point d'un protocole de purification est élaborée en fonction du degré de pureté désiré. Si le produit final est destiné à des essais d'application en conservation alimentaire, le rendement de purification sera privilégié face au degré de pureté. En revanche, si le but est l'étude structurale de la molécule, le produit final devra présenter un haut degré de pureté imposant dans la plupart des cas un rendement de purification faible.

La purification des bactériocines de bactéries lactiques est une tâche particulièrement difficile (Muriana *et al.*, 1991 ; Carolissen-Mackay *et al.*, 1997). Les problèmes rencontrés sont tout d'abord liés au fait que les molécules à purifier sont sécrétées dans un milieu de culture complexe comme le milieu MRS contenant 20 g.L⁻¹ de peptides. Pour cette raison, des auteurs ont eu recours à des milieux chimiquement définis (Hécharde *et al.*, 1992) ou semi-définis (Barefoot *et al.*, 1994). D'autres bactériocines ont tendance à s'associer entre elles ou avec d'autres espèces moléculaires. Dans ce cas, il est nécessaire d'utiliser des agents dissociants tels que l'urée ou le dodécylsulfate de sodium (Joerger *et al.*, 1986 ; Muriana *et al.*, 1991 ; Barefoot *et al.*, 1994). De plus, des pertes importantes d'activité sont souvent observées pendant la purification (Rammelsberg *et al.*, 1990 ; Henderson *et al.*, 1992). Ces pertes peuvent être dues à des phénomènes d'adsorption irréversible des bactériocines sur des supports non spécifiques tels que les membranes de filtration, les supports de chromatographie ou le matériel standard de laboratoire. Dans ce cas, l'utilisation de matériels siliconés est préconisée. La perte d'activité peut être due à la dégradation des peptides d'intérêt par des protéases présentes dans l'extrait brut ; il est donc préférable de pasteuriser les préparations contenant les bactériocines, en général thermostables (Piard *et al.*, 1992).

Dans la plupart des cas, la purification des bactériocines se déroule en deux étapes. La première consiste en une pré-purification par précipitation des protéines par du sulfate d'ammonium, par acidification ou encore par partition différentielle dans des solvants organiques. Lors d'une deuxième étape, les protéines précipitées sont solubilisées et purifiées par une succession de techniques plus fines incluant des chromatographies d'exclusion de taille (tamisage moléculaire), d'échanges d'ions, d'interactions hydrophobes et liquides hautes performances en phase inverse (RP-HPLC) (Jack *et al.*, 1995 ; Jack *et al.*, 1996 ; Parente *et al.*, 1999). Les chromatographies d'échanges de cations ou d'interactions hydrophobes sont souvent plus efficaces de par la nature cationique et hydrophobe des bactériocines (De Vuyst *et al.*, 1992 ; Parente *et al.*, 1999 ; De Vuyst *et al.*, 2007). Cependant, il n'existe pas de généralités et les techniques de purification utilisées sont nombreuses et variées.

Un protocole commun a cependant pu être établi. Ce protocole a été utilisé pour la purification de nombreuses bactériocines (Holo *et al.*, 1991 ; Nieto Lozano *et al.*, 1992 ; Nissen-Meyer *et al.*, 1992 ; Cintas *et al.*, 1995 ; Cintas *et al.*, 1998 ; Mortvedt *et al.*, 1991 ; Stoffels *et al.*, 1992 ; Tichaczek *et al.*, 1992 ; Stoffels *et al.*, 1993 ; Atrih 1994 ; Tichaczek *et al.*, 1994 ; Jimenez-Diaz *et al.*, 1995 ; Benoit *et al.*, 1997 ; Herbin *et al.*, 1997). Ce protocole, réadapté dans certains cas, est composé de quatre étapes : une précipitation au sulfate

d'ammonium, une chromatographie échangeuse de cations, une chromatographie d'interactions hydrophobes et une chromatographie en phase inverse utilisant le méthanol ou l'acétonitrile comme solvant d'éluion.

Une méthode rapide et spécifique de purification partielle de peptides antibactériens, fondée sur les phénomènes d'adsorption/désorption des bactériocines sur les membranes des cellules productrices en fonction du pH, a également été mise au point (Yang *et al.*, 1992). Cette méthode a notamment permis d'obtenir des préparations concentrées de bactériocines partiellement purifiées contenant peu de protéines contaminantes malgré des rendements relativement faibles. Ces préparations, soumises à une chromatographie liquide haute performance, permettent l'obtention de bactériocines avec un degré de purification élevé. Certains auteurs proposent des modifications à ce protocole en utilisant des supports d'adsorption non cellulaires, comme des silices hydrophiles ou hydrophobes (Daeschel *et al.*, 1992 ; Wan *et al.*, 1996) ou de silicate de calcium (Coventry *et al.*, 1996b ; Revol-Junelles *et al.*, 1996b).

Une autre méthode de purification de bactériocines en deux étapes a été développée pour une bactériocine de la sous-classe IIa produite par *C. divergens* (Metivier *et al.*, 2000). La première étape consiste en une partition de solvant (Triton X-114) et la deuxième en une chromatographie échangeuse de cations. Les rendements de cette méthode restent faibles, de l'ordre de 10 mg par litre de culture. Enfin, une méthode de purification en trois étapes a été mise au point pour purifier les bactériocines de la sous-classe IIa avec un meilleur rendement (environ 60 %) (Guyonnet *et al.*, 2000). Dans ce protocole, la première étape de précipitation des protéines par le sulfate d'ammonium est remplacée par une étape d'autoclavage (12 min, 110 °C) et une chromatographie échangeuse de cations. Les deux étapes suivantes ne diffèrent pas des autres protocoles de purification déjà développés et comportent une chromatographie d'interactions hydrophobes suivie d'une chromatographie liquide haute performance.

Toutes ces méthodes permettent d'obtenir des bactériocines actives, certes avec un haut degré de pureté mais avec des rendements faibles.

VI.2 Améliorations de la production

De nombreux travaux ont visé l'optimisation de la production de la bactériocine ou l'amélioration des souches productrices.

Une même souche peut produire plusieurs bactériocines ; les caractéristiques physico-chimiques étant semblables entre ces divers peptides antibactériens, il est donc difficile de les séparer les uns des autres. Certaines conditions culturales permettent de produire

préférentiellement une bactériocine par rapport à une autre. Chez *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52, la température d'incubation joue un rôle important sur la production des mésentérocinés 52A et 52B (Krier *et al.*, 1998). Si l'incubation est réalisée à 20 °C, la synthèse de la mésentérociné 52A est majoritaire ; en revanche, si la température est fixée à 25 °C, la production de la mésentérociné 52B est favorisée. Le pH et la température ont également une influence sur la production de bactériocine par *Lb. curvatus* LTH 1174 (Messens *et al.*, 2003). Ces stratégies ne suffisent pas cependant pour améliorer le rendement de production. Or un rendement élevé de production de la protéine d'intérêt facilite les étapes de purification qui suivent. C'est pourquoi les travaux les plus récents visent à la production par modifications génétiques des souches, voire d'utiliser l'expression hétérologue avec des espèces bactériennes totalement différentes de celles naturellement productrices.

L'intérêt pour les systèmes de sécrétion hétérologue est non négligeable et ne s'arrête pas seulement au fait de produire de grandes quantités de bactériocines. En effet, introduire les gènes codant une bactériocine et son système de sécrétion dans une souche à potentiel agro-alimentaire permettrait une meilleure protection des produits contre les flores pathogènes ou d'altération en évitant l'utilisation d'additifs. C'est le cas de la pédiocine PA-1 produite par *Lc. lactis* (Horn *et al.*, 1999) ou de l'acidocine A produite par *Lb. casei* (Kanatani *et al.*, 1995). De même, une souche capable de produire diverses bactériocines permettrait d'étendre le spectre d'activité vis-à-vis des contaminants. Cependant, ces applications restent restreintes en raison de difficultés techniques et des restrictions législatives. La production hétérologue de grande quantité de peptides s'avère pour le moment davantage utilisée pour les études fondamentales (structure, mécanismes d'action).

Il a été démontré que les systèmes de transport dédié (DTS) à une bactériocine peuvent être utilisés pour la maturation et la sécrétion de bactériocines de la sous-classe IIa (Horn *et al.*, 1998 ; Horn *et al.*, 1999 ; Morisset *et al.*, 2002 ; Horn *et al.*, 2004). Les constructions génétiques retenues pour la production hétérologue de bactériocines sont variables. L'une d'entre-elles consiste en la construction d'un plasmide réunissant l'opéron codant la prébactériocine et sa protéine d'immunité associée, d'une part et l'opéron codant le DTS, d'autre part. Ce type de construction a été utilisé pour la production de la mésentéricine Y105 par *Ln. mesenteroides* DSM 20484 (Biet *et al.*, 1998) et par *Lb. johnsonii* (producteur de la lactacine F) (Fremaux *et al.*, 1995) ainsi que pour la production de l'entérociné A par *E. faecalis* et *Lc. lactis* (O'Keeffe *et al.*, 1999).

Cette liste n'est pas exhaustive car de nombreuses études sur la production hétérologue ont été publiées (Rodriguez *et al.*, 2003). Dans certains cas, la présence d'un peptide

d'induction est indispensable pour la production (O'Keeffe *et al.*, 1999). Un autre système de production hétérologue repose sur l'utilisation de deux plasmides. Le premier contient les gènes codant la prébactériocine et sa protéine d'immunité, le second les gènes codant le DTS. Ce système a été utilisé pour la production de la pédiocine PA-1 (Horn *et al.*, 1998). Dans certains cas, le DTS employé n'est pas celui associé naturellement à la bactériocine (Allison *et al.*, 1995a ; Allison *et al.*, 1995b ; Chikindas *et al.*, 1995b ; Horn *et al.*, 1998 ; Horn *et al.*, 1999 ; Martinez *et al.*, 2000).

Différents éléments semblent influencer l'efficacité de la production hétérologue :

(i) le nombre de copies de gènes. L'utilisation de plasmide(s) à fort nombre de copies semble être un avantage (Leer *et al.*, 1995 ; Biet *et al.*, 1998 ; Horn *et al.*, 1998 ; Horn *et al.*, 1999 ; Martinez *et al.*, 2000) ;

(ii) le type de promoteur utilisé : l'expression de l'opéron pédiocine chez *Lc. lactis* n'est possible que sous le contrôle du promoteur fort P32 de *Lactococcus* et non avec le promoteur propre de *P. acidilactici* (Chikindas *et al.*, 1995b). De même, la production de la pédiocine PA-1 et de la sakacine P, en utilisant le DTS de la sakacine A, n'est possible chez *Lb. sakei* que sous le contrôle du promoteur *sakA* (Axelsson *et al.*, 1998). La faible production de la lactacine F (bactériocine à deux composants produite par *Lb. johnsonii*) chez *Ln. gelidum* (producteur naturel de la leucocine A) et chez *C. maltaromaticum* (producteur des carnobactériocines A, B2 et BM1) est probablement attribuée à une faible reconnaissance du promoteur par la souche hôte (Allison *et al.*, 1995a ; Allison *et al.*, 1995b) ;

(iii) la séquence du peptide leader (signal) est importante. En effet, cette séquence de la prébactériocine doit être reconnue par un DTS d'une autre bactériocine. Il semble, au moins pour les bactériocines de la sous-classe IIa, que l'efficacité de transport et de maturation d'un DTS, pour une bactériocine autre que celle qui lui est naturellement associée, est très dépendante des homologies de séquences entre les peptides leaders (Ennahar *et al.*, 2000b). Ainsi, une fusion entre le peptide leader de la sakacine A et la sakacine P mature a permis la sécrétion par *Lb. sakei* de la sakacine P *via* le DTS de la sakacine A ; la sakacine P est aussi sécrétée grâce à son propre peptide leader (Axelsson *et al.*, 1998). De même, la fusion du peptide leader de la lactococcine A avec la pédiocine PA-1 a permis la sécrétion de cette dernière par le DTS associé à la lactococcine A chez *Lc. lactis* (Horn *et al.*, 1998 ; Horn *et al.*, 1999). Une autre explication de la faible production de la lactacine F chez *Ln. gelidum* et chez *C. maltaromaticum* serait un problème de reconnaissance des peptides leaders des deux peptides par les DTS de la leucocine A et des carnobactériocines (Allison *et al.*, 1995a ; Allison *et al.*, 1995b). Enfin, des fusions entre les séquences leaders des leucocine A,

lactococcine A, colicine V d'une part, et la divergicine mature d'autre part, ont été effectuées et exportées avec succès par les hôtes homologues aux peptides leaders (respectivement *Ln. gelidum*, *Lc. lactis* et *E. coli*,) (van Belkum *et al.*, 1997). L'expression hétérologue d'une fusion peptide leader de la leucocine A/colicine V a été testée avec succès chez *Lc. lactis*, mais les rendements sont faibles. Paradoxalement, cette fusion n'a pas pu être exportée par *Ln. gelidum* malgré la présence du peptide leader de la leucocine A (van Belkum *et al.*, 1997).

Les rendements de production de bactériocines (transport et/ou maturation) sont en général inférieurs à ceux obtenus avec l'hôte naturel (Ennahar *et al.*, 2000b), exception faite de rares cas où cette production est similaire, voire légèrement plus élevée (Axelsson *et al.*, 1998 ; Horn *et al.*, 1999). Il est à noter qu'il est possible de produire de façon concomitante plusieurs bactériocines par le même hôte hétérologue (Allison *et al.*, 1995a ; Allison *et al.*, 1995b ; Chikindas *et al.*, 1995b ; Horn *et al.*, 1999 ; Martinez *et al.*, 2000).

Des essais de productions hétérologues, impliquant un export des bactériocines *via* le système *sec*, ont été effectués. Ainsi, la phosphatase alcaline a été exportée chez *E. coli* en utilisant la séquence signal N-terminale de la divergicine (produite par *C. divergens*) (Worobo *et al.*, 1995). La divergicine a aussi été produite chez *C. maltaromaticum*, *C. divergens*, *Lc. lactis* et *E. coli* (Worobo *et al.*, 1995). Des travaux ont étudié la sécrétion d'une protéine de fusion, peptide leader de la divergicine/mésentéricine Y105, par la voie *sec* chez *E. coli*, *Leuconostoc* sp. et chez *Lc. lactis* (Biet *et al.*, 1998). Ces auteurs ont observé une production de la mésentéricine Y105 chez *E. coli*, mais la bactériocine semble entraîner une toxicité périplasmique pour la bactérie. La prémésentéricine Y105 a été également produite avec le même type de construction. Cependant, aucune production de la bactériocine mature n'a pu être observée, bien que la transcription du plasmide semble avoir lieu chez *Lc. lactis*, alors que la divergicine (Worobo *et al.*, 1995) et la carnobactériocine A (McCormick *et al.*, 1996) ont été sécrétées par la voie *sec* chez le même hôte. En revanche, une petite quantité de bactériocine est obtenue chez *Ln. mesenteroides*. Cette différence de production selon l'hôte est à rapprocher des résultats obtenus avec un plasmide portant l'ensemble des gènes impliqués dans la production et la sécrétion de la mésentéricine Y105. Ce plasmide permet de produire la bactériocine chez *Ln. mesenteroides* (Biet *et al.*, 1998). En revanche, aucune production n'est détectée avec ce même plasmide chez *Lc. lactis* (Biet *et al.*, 1998). Dans les deux souches, la transcription du gène recombinant est visualisée, ce qui permet de supposer que la différence entre les deux hôtes se situe au niveau post-transcriptionnelle. Les auteurs ont suggéré que le peptide est dégradé ou piégé après sa synthèse chez *Lc. lactis* (Biet *et al.*, 1998).

La production de bactériocines, utilisant la voie générale de sécrétion *sec*, apparaît donc possible. Néanmoins, considérant sa faible efficacité par rapport aux systèmes DTS, elle ne peut susciter qu'un faible intérêt.

Même si les systèmes DTS semblent plus efficaces, les quantités produites restent très faibles. A ceci s'ajoute la sécrétion du peptide dans un milieu de culture rendant les étapes de purification plus difficiles. Pour pallier ces problèmes, de nouveaux systèmes de surexpression ont été développés.

Ces systèmes reposent généralement sur la synthèse d'une protéine de fusion thiorédoxine-bactériocine grâce un plasmide de type pET (Novagen®). Cette protéine de fusion n'est pas sécrétée dans le milieu de culture ; elle s'accumule dans le cytoplasme de la bactérie productrice et sa toxicité est très faible. Plusieurs bactériocines ont été produites avec ce type de construction telles que la piscicoline 126 (Gibbs *et al.*, 2004), la divercine V41 (Richard *et al.*, 2004a) et l'entérocin P (Cuozzo *et al.*, 2006). La protéine de fusion comportant un motif poly-histidine est aisément purifiée par une chromatographie d'affinité IMAC (Immobilized Metal ion Assay Chromatography). La bactériocine est clivée de la protéine porteuse soit par voie enzymatique (entérokinase) soit par voie chimique (CNBr). Après clivage, la bactériocine est purifiée par chromatographie IMAC ou par chromatographie liquide haute performance (HPLC). Bien que les rendements soient plus élevés avec cette approche, ceux-ci restent encore faibles et sont de l'ordre de 20 mg par litre de culture. De plus, la bactériocine produite après clivage peut présenter à l'extrémité N-terminale des résidus d'acides aminés additionnels, lesquels résultent de la façon dont ont été conçus les plasmides (Richard *et al.*, 2004a).

D'autres types de domaines ont été fusionnés aux bactériocines afin de permettre leur purification. Ainsi, l'entérocin A a été fusionnée à un domaine de liaison à la cellulose (Klocke *et al.*, 2005) et la pédiocine PA-1 a quant à elle été fusionnée à la « *Maltose Binding Protein* » (Miller *et al.*, 1998a). Certains auteurs ont tenté de produire une bactériocine sans protéine de fusion (Gutierrez *et al.*, 2005a ; Ingham *et al.*, 2005), l'étape d'IMAC étant remplacée par une immunochromatographie ou par une HPLC, mais les rendements sont plus faibles que ceux obtenus avec la construction décrite précédemment.

La plupart des systèmes génétiques qui ont été développés pour l'hôte *E. coli* permettent une induction de la production de la protéine de fusion grâce au promoteur *Lac* par ajout d'un inducteur non métabolisé (« gratuit »), l'IPTG (isopropyl- β -thio-galactoside). Ce système permet de produire la protéine d'intérêt en deux étapes. Dans un premier temps, la biomasse est produite et dans un second temps, la synthèse de la protéine est induite. Le découplage de

ces deux étapes permet de s'affranchir d'un éventuel effet négatif de la protéine recombinante sur la croissance et la survie bactérienne.

Dans le cas où une bactérie lactique telle que *Lc. lactis* est utilisée comme hôte, d'autres types de promoteurs peuvent être utilisés comme le NICE (*Nisin-controlled gene expression system*) qui peut être induit par la nisine (Mierau *et al.*, 2005).

L'hôte utilisé lors de la production hétérologue est généralement *E. coli*, mais il est possible de produire des bactériocines dans des levures, comme *Pichia pastoris* (Gutierrez *et al.*, 2005b ; Sanchez *et al.*, 2008) ou *Saccharomyces cerevisiae* (Van Reenen *et al.*, 2003). Les rendements de production varient selon la levure et le plasmide utilisés mais ils sont généralement similaires à ceux obtenus avec un hôte bactérien.

Les constructions plasmidiques favorisant la purification étant établies, certains auteurs se sont focalisés sur la phase de production. Cette étape est alors réalisée dans un bioréacteur régulé soit avec un procédé discontinu (*batch*) soit avec un procédé semi-continu (*fed-batch*). Ce procédé permet d'obtenir une grande quantité de biomasse et donc une grande quantité de protéine de fusion. Les rendements obtenus sont de l'ordre de 30 à 70 mg par litre de culture (Yildirim *et al.*, 2007).

Résultats

Chapitre II : Résultats

I. Analyse du mécanisme d'action de la mésentérocine 52A par anisotropie de fluorescence

I.1 Introduction

Il est généralement admis que le mécanisme d'action des bactériocines de la sous-classe IIa se décompose en au moins deux étapes (Moll *et al.*, 1999a ; Shai 1999). La première consiste en l'adsorption du peptide non structuré sur la membrane de la cellule cible par l'établissement de liaisons électrostatiques ou par affinité avec un récepteur membranaire spécifique. La présence d'un récepteur spécifique a été mise en évidence chez *Enterococcus sp.* et *Listeria sp.* : il s'agirait d'une mannose-perméase (Dalet *et al.*, 2000 ; Dalet *et al.*, 2001 ; Héchard *et al.*, 2001 ; Diep *et al.*, 2007).

Une fois adsorbé, le peptide se structure en hélice α pour s'insérer dans la bicouche lipidique. Les conséquences de cette pénétration peuvent être multiples telles que la formation de pores provoquant la fuite de composés vitaux (acides aminés, potassium), la dissipation de la force protomotrice (potentiel de membrane et/ou gradient de proton), la déplétion du pool d'ATP (Herranz *et al.*, 2001a ; Herranz *et al.*, 2001b ; Héchard *et al.*, 2002). Il est possible également que la bactériocine ait une cible intracytoplasmique (Brogden 2005).

Pour étudier ces mécanismes, diverses techniques de biophysique sont utilisées telles que le dichroïsme circulaire, la fluorescence des résidus tryptophane ou la résonance magnétique nucléaire (Fleury *et al.*, 1996 ; Van Den Hooven *et al.*, 1996 ; Fregeau Gallagher *et al.*, 1997 ; Wang *et al.*, 1999 ; Fimland *et al.*, 2002b ; Castano *et al.*, 2005 ; Haugen *et al.*, 2005). La plupart de ces études sont réalisées sur des modèles de type liposome ou monocouche de phospholipides mimant une membrane bactérienne. Cependant ces modèles simplifiés sont loin de représenter la complexité de la membrane bactérienne. La polémique sur l'existence d'un récepteur spécifique en est une illustration.

Dans cette étude, nous avons étudié le mécanisme d'action de la mésentérocine 52A sur deux souches de *Listeria*, *L. ivanovii* CIP 12510 et *L. innocua* CIP 12511. Ces deux souches présentent la même concentration minimale inhibitrice. Cependant, lors de la détermination de l'activité antibactérienne du peptide par la méthode de diffusion en milieu solide, *L. ivanovii* CIP 12510, contrairement à l'autre souche de *Listeria*, est capable de croître à nouveau dans la zone d'inhibition.

Pour comprendre cette différence de comportement, la surface des cellules a été caractérisée par la méthode d'adhésion aux solvants (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996). De plus, l'influence de divers glucides sur la sensibilité des souches vis-à-vis de la mésentérocine 52A a été testée. Certains glucides, tels que le glucose ou le mannose, devraient augmenter l'expression de la mannose-perméase, donc la sensibilité. D'autres glucides tels que le cellobiose devraient réprimer l'expression de ce récepteur potentiel.

Le degré de pénétration de la mésentérocine 52A dans la membrane cytoplasmique des deux souches a été déterminé en mesurant l'anisotropie de fluorescence de deux sondes, le DPH et le TMA-DPH, qui ont une localisation différente dans la bicouche lipidique. D'autres conséquences de la pénétration du peptide ont été étudiées telles que la dissipation de la force protomotrice et les fuites de potassium.

I.2 “Fluorescence anisotropy analysis of the mechanism of action of mesenterocin 52A: speculations on antimicrobial mechanism”

Fluorescence anisotropy analysis of the mechanism of action of mesenterocin 52A: speculations on antimicrobial mechanism

Jordane Jasniewski · Catherine Cailliez-Grimal ·
Mohamed Younsi · Jean-Bernard Millière ·
Anne-Marie Revol-Junelles

Abstract Mesenterocin 52A (Mes 52A) is a class IIa bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52, active against *Listeria sp.* The interaction of Mes 52A with bacterial membranes of two sensitive *Listeria* strains has been investigated. The Microbial Adhesion to Solvents test used to study the physico-chemical properties of the surface of the two strains indicated that both surfaces were rather hydrophilic and bipolar. The degree of insertion of Mes 52A in phospholipid bilayer was studied by fluorescence anisotropy measurements using two probes, 1-(4-trimethylammonium)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene (TMA-DPH) and DPH, located at different positions in the membrane. TMA-DPH reflects the fluidity at the membrane surface and DPH of the heart. With *Listeria ivanovii* CIP 12510, Mes 52A induced an increase only in the TMA-DPH fluorescence anisotropy, indicating that this bacteriocin affects the membrane surface without penetration into the hydrophobic core of the membrane. No significant K^+ efflux was measured, whereas the $\Delta\Psi$ component of the membrane potential was greatly affected. With *Listeria innocua* CIP 12511, Mes 52A caused an increase in the fluorescence of TMA-DPH and DPH, indicating that this peptide inserts

deeply in the cytoplasmic membrane of this sensitive strain. This insertion led to K^+ efflux, without perturbation of ΔpH and a weak modification of $\Delta\Psi$, and is consistent with pore formation. These data indicate that Mes 52A interacts at different positions of the membrane, with or without pore formation, suggesting two different mechanisms of action for Mes 52A depending on the target strain.

Keywords Bacteriocin · Anisotropy · Antimicrobial peptide · MIC

Introduction

Bacteriocins are ribosomally synthesized antimicrobial peptides generally active against close phylogenetically bacteria (Tagg et al. 1976). They were classified into four classes, with the class II the most represented (Klaenhammer 1993). The characteristics of these peptides are small molecular weight (<10 kDa), heat-stable (120°C, 20 min), and without a lanthionine residue. This class has been divided in three subclasses based on the sequence homology of the peptides and the similarities in their mechanism of action. The class IIa bacteriocins (pediocin-like) have an anti-*Listeria* activity and share high similarities in their primary sequence with an N-terminal consensus sequence (YGNGV) and two cysteinyl residues involved in a disulfide bridge (Fimland et al. 2005). More than 20 of these cationic peptides have been identified and contain 37 to 48 residues. The N-terminal domain is cationic and largely hydrophilic and forms an S-shaped three-stranded antiparallel β -sheet-like structure. This domain is separated from the more hydrophobic/amphiphilic C-terminal domain by a hinge (Fregeau Gallagher et al. 1997; Fimland et al. 2006).

J. Jasniewski · C. Cailliez-Grimal · J.-B. Millière ·
A.-M. Revol-Junelles (✉)
Institut National Polytechnique de Lorraine,
Laboratoire de Science et Génie Alimentaires, Nancy-Université,
2 avenue de la Forêt de Haye B.P. 172,
54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France
e-mail: Anne-Marie.Revol@ensaia.inpl-nancy.fr

M. Younsi
Laboratoire de Nutrition et Maladies Métaboliques-EA
3446-Faculté de Médecine, Nancy-Université,
8 avenue de la Forêt de Haye,
54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

The mechanism of action of these class IIa bacteriocins is probably composed of two steps (Moll et al. 1999; Shai 1999). The first step is the adsorption of the unstructured peptide on the cytoplasmic membrane by electrostatic interactions and/or by affinity interactions with a receptor. The N-terminal domain appears to be involved in the initial binding of the peptide to the target cell surface. The second step is the formation of the α -helix motif in the C-terminal part which permits the bacteriocin to penetrate into the membrane. The mechanisms by which bacteriocins inhibit or kill sensitive microorganisms are not fully understood. They mainly dissipate the proton motive force (PMF), i.e., the membrane potential ($\Delta\Psi$) and the pH gradient (ΔpH), and/or induce the leakage of molecules and/or the depletion of the adenosine triphosphate pool (ATP) from several sensitive strains (Herranz et al. 2001a, b; Hechard and Sahl 2002) The bacteriocin could also penetrate into the cell and target a cytoplasmic component (Brogden 2005).

Mesenterocin 52A (Mes 52A) is a class IIa bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* FR52. It is identical to mesentericin Y105 (MesY105) which presents a high similarity and homology with leucocin A with only two amino acid residues difference in their sequence (Hechard et al. 1992; Revol-Junelles et al. 1996). Circular dichroism data of MesY105 in buffer solution indicate that the N-terminal domain is capable of involvement in interaction with a putative receptor, while the α -helix from residue 17 to 31 would allow lipid binding to the membrane (Fleury et al. 1996). Interactions of MesY105 with biological membranes were mainly studied with purified phospholipids monolayers and vesicles by tryptophan fluorescence experiments and by polarization modulation infrared reflection absorption spectroscopy (Castano et al. 2005). Many studies on membrane-peptide interactions were performed on model membranes (Castano et al. 2005; Fimland et al. 2006; Zhao et al. 2006). There is a difference between such models and bacterial cells (Papo and Shai 2003).

In this paper, to get more insight into the interaction of Mes 52A with intact bacterial membrane, we studied the effect of Mes 52A on membrane of two sensitive *Listeria* sp. strains. Penetration of the peptide in the targeted viable cell membranes was studied by fluorescence anisotropy using two probes, 1-(4-trimethylammonium)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene (TMA-DPH) and 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH), which are reported to localize at different positions in the membrane {Denich 2003 #1074}. Subsequently, the influence of Mes 52A on potassium efflux, $\Delta\Psi$ and ΔpH , was determined. Results obtained with these two *Listeria* sp. strains suggest that Mes 52A exhibits different mechanisms of action according to the targeted sensitive strain.

Materials and methods

Bacterial strains and culture conditions

Listeria strains were purchased from different private and public collections (Table 1) and were cultivated in trypticase soy broth (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) supplemented with 6 g L⁻¹ of bacto-yeast extract [Biokar; tryptic soy broth (TSB)-yeast extract(YE)] and incubated at 30°C or 37°C (Table 1). Agar medium [tryptic soy agar (TSA)-YE] was prepared by addition of 15 g L⁻¹ of bacteriological agar type A (Biokar). Strains were stored in TSB-YE medium supplemented with glycerol (10%) at -30°C and propagated twice before use.

Enumeration was determined by decimal dilutions of the cultures and plated on agar medium using a spiral plating (Whitley Automatic Spiral Plater, WASP 2, AES Laboratoire, Combourg, France).

Determination of antibacterial activity

Antilisterial activity of Mes 52A was determined by the agar well diffusion method (Mathieu et al. 1993). Mes 52A was obtained by chemical synthesis (Synt:em, Nimes, France) at 90–95% of purity according to the published sequence (Revol-Junelles et al. 1996). This bacteriocin (220 mg L⁻¹) was prepared in a phosphate buffer (5 mM, pH 6.5). The protein concentration was checked by using the Bradford method (Bradford 1976).

The six strains of *Listeria* were inoculated in TSA-YE medium (1.2% bacteriological agar, Biokar) supplemented with 1% Tween 80 (Merck, Darmstadt, Germany) and

Table 1 Spectrum of activity of Mes 52A against different *Listeria* species

Bacterial species	Strain designation	Incubation temperature (°C)	Inhibition diameter ^a (mm)
<i>Listeria monocytogenes</i>	CIP 7831	37	4 ^b
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 15313	37	6 ^b
<i>Listeria innocua</i>	CIP 12511	30	13
<i>Listeria ivanovii</i>	CIP 12510	30	10 ^b
<i>Listeria ivanovii</i>	LMA 94	30	7 ^b
<i>Listeria grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	CIP 7818	30	10 ^b

Public collections: CIP Collection de l'Institut Pasteur (Paris, France), ATCC American Type Culture Collection (Rockville, USA); private collection: LMA Laboratoire de Microbiologie Alimentaire, ENSAIA-INPL (Nancy, France).

^a SD ≤ 1

^b Regrowth in the inhibition area

poured in Petri dishes. A 25- μ L volume of Mes 52A (220 mg L⁻¹) in phosphate buffer (5 mM, pH 6.5) was placed into a 5-mm diameter agar well. Agar plates were placed overnight at 4°C and then incubated at 30°C for at least 10 h. The diameters of inhibition areas were measured. Assays were performed in triplicate.

The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined by the critical dilution method in 96-wells plates (Nunc, Roskilde, Denmark; Verheul et al. 1997). Mes 52A was prepared in the phosphate buffer. The two target strains were prepared in TSB-YE medium to a final 0.01 O.D₆₆₀. The plates were shaken (Titramax 100, Bioblock Fisher Scientific, Illkirch, France), and the initial O.D₆₆₀ was determined with a Titertek Multiscan MCC/340 (Huntsville, AL, USA). The plates were incubated at 30°C for 24 h. The MIC value (mg L⁻¹) is the inverse of the highest dilution where no growth is detected.

The minimal bactericidal concentration (MBC) was determined by subculturing each of the no-growth plates in the above MIC test to a solid medium that did not contain Mes 52A. The MBC is identified as the smallest concentration of peptide that prevents any growth of the test bacterium.

For the further experiments, two target strains were chosen, *Listeria ivanovii* CIP 12510 and *Listeria innocua* CIP 12511.

Determination of the mode of action

TSB-YE medium was inoculated with a 16-h subculture of the two target *Listeria* strains in order to reach 10³ cfu mL⁻¹. Mes 52A was added at final concentration of 1× MIC and 2× MIC, and cultures were incubated at 30°C during 50 h. Bacterial enumeration was performed as described previously.

Effect of sugars on Mes 52A sensitivity

Luria–Bertani (LB) medium supplemented or not with sugars (i.e., glucose, maltose, mannose, cellobiose, fructose) at a final concentration of 2 g L⁻¹ was inoculated with the two target *Listeria* strains to an initial O.D₆₆₀ of 0.05. After 3 h of incubation, when the O.D₆₆₀ ≥ 0.1, Mes 52A was added at 1× MIC. Bacterial growth was monitored by spectrophotometric measurements (O.D₆₆₀). Assays were performed in triplicate.

Evaluation of bacterial surface hydrophobicity and Lewis acid–base character

Microbial Adhesion to Solvents (MATS) method was used for the evaluation of the hydrophobic/hydrophilic cell surface properties of the strains and their Lewis acid–base

characteristics. The polar solvent can be an electron acceptor or an electron donor and was compared with a nonpolar solvent which exhibited similar van der Waals surface tension components (Bellon-Fontaine et al. 1996).

The following pairs of solvents were selected:

- chloroform, an electron acceptor solvent, and hexadecane, a nonpolar solvent
- ethyl acetate, an electron donor solvent, and decane, a nonpolar solvent
- diethyl ether, an electron donor, and hexadecane, a nonpolar solvent

A microbial suspension containing approximately 10⁸ cfu mL⁻¹ in 2.4 mL of 1.5×10⁻¹ M NaCl was vortexed for 90 s with 0.4 mL of a solvent. The mixture was allowed to stand for 15 min to ensure that the two phases were completely separated before a sample (1 mL) was carefully removed from the aqueous phase and the optical density at 660 nm was determined. The percentage of cells present in each solvent was subsequently calculated by using the equation: %Affinity = 100 × [-(A/A₀)], where A₀ is the optical density at 660 nm of the bacterial suspension before mixing and A is the optical density after mixing. Each experiment was performed in triplicate by using three independently prepared cultures.

Measurements of ΔpH and ΔΨ

Nigericin and valinomycin (Sigma-Aldrich) were prepared in chloroform or in dimethylsulfoxide, respectively, to a concentration of 10 mM.

Cells were harvested in the log growth phase (O.D₆₆₀ = 0.6), washed twice with ice-cold 50 mM 4-2-hydroxyethyl-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) buffer containing 0.6 mM of KCl, glucose 0.2%, adjusted at pH 7.0 with KOH 40%, resuspended in the same buffer to 1/100 of their initial volume, and stored on ice.

The ΔΨ was qualitatively measured with the fluorescent probe 3,3'-dipropylthiadicarbocyanine iodide [(DiSC₃(5); Sigma-Aldrich]. Glucose-energized cells (to a final population of 2.5×10⁸ cfu mL⁻¹) were added to quartz cuvette containing HEPES buffer and DiSC₃(5) (5 μM). Next, after 3 min of incubation with nigericin (1.5 nM), which dissipates the pH gradient (ΔpH), Mes 52A (1× MIC) or valinomycin (1.5 nM) were added. Fluorescence measurements were performed with a spectrofluorometer FLX (Safas-Monaco, Monaco) at 622 and 670 nm for excitation and emission, respectively (Herranz et al. 2001a, b).

The ΔpH was measured with the fluorescent probe 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5[and 6]-carboxyfluorescein acetoxy-methyl ester (BCECF-AM; Sigma-Aldrich; Molenaar et al. 1991). Glucose-energized, BCECF-AM-loaded cells (final population of 2.5×10⁸ cfu mL⁻¹) were added to a stirred

cuvette containing 50 mM phosphate buffer, pH 6.0. Then, after 3 min of incubation with valinomycin (1.5 nM), which dissipates the $\Delta\Psi$, Mes 52A ($1\times$ MIC) or nigericin (1.5 nM) were added. Fluorescence was measured at 482 and 528 nm for excitation and emission, respectively.

All measures were determined in triplicate.

Effect of the Mes 52A on the potassium efflux

Stationary-phase cells were harvested by centrifugation ($10,000\times g$ at 4°C , 15 min). The pellets were washed three times with tryptone-salt (TS; 0.9%) supplemented with glucose (1%). Cells were resuspended in TS-glucose to a final population of 2.5×10^8 cfu mL⁻¹. Mes 52A or the same volume of buffer without the peptide was added to a final concentration corresponding to $0.5\times$ MIC and MIC. Cells were incubated with Mes 52A for 60 min at 30°C . The cells were harvested by centrifugation ($10,000\times g$ at 4°C , 15 min), and the concentration of the potassium of the supernatant was determined with the atomic absorption spectrophotometer 1100 (Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France).

Measurements of the anisotropy of fluorescence

The two *Listeria* strains were cultivated in 50 mL of TSB-YE medium during 16 h at 30°C . The bacterial cells were harvested by centrifugation ($10,000\times g$ at 4°C , 15 min) and washed three times with the anisotropy buffer [Na_2HPO_4 , 3 g L⁻¹; KH_2PO_4 , 6 g L⁻¹; NaCl, 2 g L⁻¹; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 8 g L⁻¹; pH 7.6]. Cell pellets were suspended in the same buffer to obtain a final concentration around 2.5×10^8 cfu mL⁻¹ and were stored at -30°C .

The experiments were realized in the dark to preserve fluorescent probes. The fluorescence anisotropy measurements of cells labeled with DPH or TMA-DPH were carried out with a T-format continuous excitation device (Fluofluimeter, Regulest, Florange, France). The intensities were also measured on blank samples (unlabeled cells) for correction (Kuhry et al. 1983; Kuhry et al. 1985). The fluorescent probe TMA-DPH (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) was prepared in *N,N*-dimethylformamide to a final concentration of 2 mM. The DPH probe (Sigma-Aldrich) was prepared in tetrahydrofuran to a final concentration of 2 mM. The samples were pre-incubated at 30°C (Thermoblock, FALC, Treviglio, Italy). Diluted cell suspension (3 mL) in a quartz cuvette was labeled with 3 μL of TMA-DPH or DPH solution for 7 or 30 min, respectively (Bokas et al. 2007). Mes 52A was added to a final concentration equivalent to $0.5\times$ MIC, and the suspensions were incubated during 0, 5, 15, 30, 45, 60, 90, or 120 min. The same experiment was performed with nigericin (to a final concentration of 37.3 mg L⁻¹) or with valinomycin (to a final concentration of 55.5 mg L⁻¹).

The influence of the concentration of Mes 52A was determined after 60 min of contact with a final concentration of peptide of 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, or 80 mg L⁻¹. Excitation and emission wavelengths were 365 and 425 nm, respectively.

The temperature of labeled and blank samples was rigorously controlled during the measurement, and the anisotropy was measured at the culture temperature (30°C). Five measurements were performed for each sample with five repetitions. The fluorescence anisotropy $\langle r \rangle$ was calculated as described (Kuhry et al. 1983; Kuhry et al. 1985).

To evaluate the stability of the cells during the anisotropy experiments, anisotropy buffer was inoculated with a 16-h subculture of *L. ivanovii* CIP 12510 or *L. innocua* CIP 12511 in order to reach 10^4 cfu mL⁻¹. Mes 52A was added ($0.5\times$ and $1\times$ MIC final concentration) to the cultures, and enumerations were performed on TSA-YE after 0, 20, 60, or 120 min of incubation at 30°C .

Statistical analysis

Results were analyzed using analysis of variance (Excel, Microsoft) with a model including one effect (time of contact, concentration of Mes 52A).

Results

Bacterial sensitivity to Mes 52A

Six strains of *Listeria sp.* were examined for sensitivity to Mes 52A by the agar well diffusion method. The Mes 52A gave significant zones of inhibition against these strains (Table 1). Among the most sensitive strains, two of them were selected for further experiments *L. ivanovii* CIP 12510 and *L. innocua* CIP 12511.

The activity of Mes 52A was quantified in terms of minimal inhibitory concentrations (MICs) and minimal bactericidal concentrations. The two *Listeria* strains tested, *L. ivanovii* CIP 12510 and *L. innocua* CIP 12511, exhibited similar MIC values, 0.95 mg L⁻¹ (245 nM) and 0.85 mg L⁻¹ (220 nM), respectively, with a MBC value higher than 2,000 mg L⁻¹ (516 μM).

The behavior of these *Listeria* strains was determined with Mes 52A at $1\times$ MIC and $2\times$ MIC (Fig. 1). The addition of Mes 52A to culture of the strains resulted in an immediate bacteriostatic effect. The regrowth occurred after 10 h for *L. ivanovii* CIP 12510 or 30 h with the other strain, without reaching the population level of the control culture. For *L. innocua* CIP 12511, total growth inhibition was observed with $2\times$ MIC. No variation in Mes 52A activity was noted indicating that regrowth was not associated with the loss of bacteriocin activity.

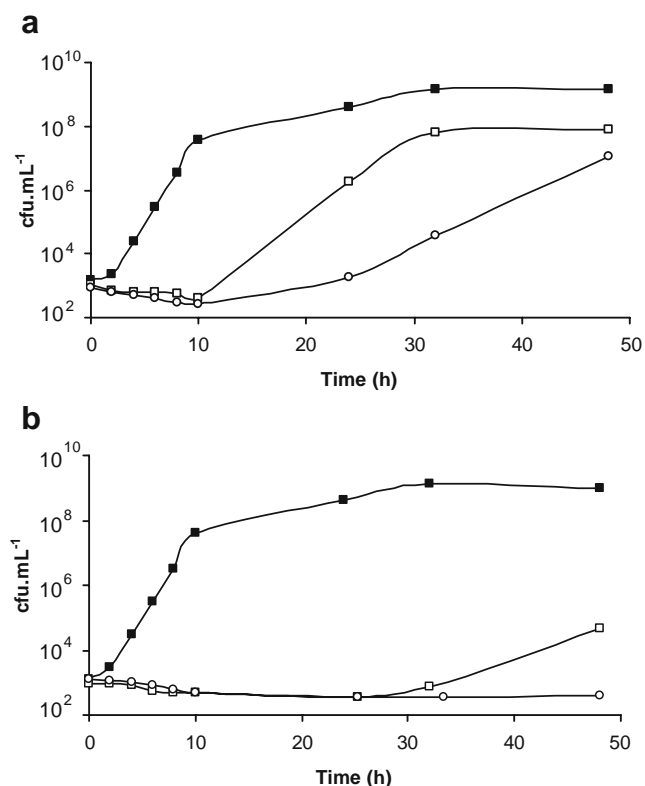


Fig. 1 Effect of Mes 52A on *L. ivanovii* CIP12510 (a) and on *L. innocua* CIP12511 (b) growth at 30°C. Closed squares Without bacteriocin, open squares at 1× MIC; open circles at 2× MIC. SD≤5%

Influence of sugars on sensitivity to Mes 52A

L. ivanovii CIP 12510 and *L. innocua* CIP 12511 were grown in LB medium supplemented with glucose, mannose, fructose, maltose or cellobiose at 2 g L⁻¹ (Fig. 2). The two strains gave similar results. In the absence of Mes 52A, no significant difference in growth curves were observed, whereas the addition of Mes 2A affected *Listeria* growth in the LB medium supplemented or not with sugars, indicating that glucose or mannose did not specifically induce sensitivity of both *Listeria* strains to Mes 52A.

Physico-chemical characterization of cell surfaces

The MATS test (Bellon-Fontaine et al. 1996) is a simple and rapid method to study the physico-chemical properties of microorganisms including their hydrophobicity and Lewis acid–base or electron acceptor/electron donor character. For all the strains tested, the percentage of adhesion to apolar solvent hexane, decane, and hexadecane is near 0, indicating that the surfaces are rather hydrophilic (Fig. 3). The two *Listeria* strains used exhibited an important percent of adhesion to chloroform, ethyl acetate, and diethyl ether, indicating bipolar character, at once Lewis

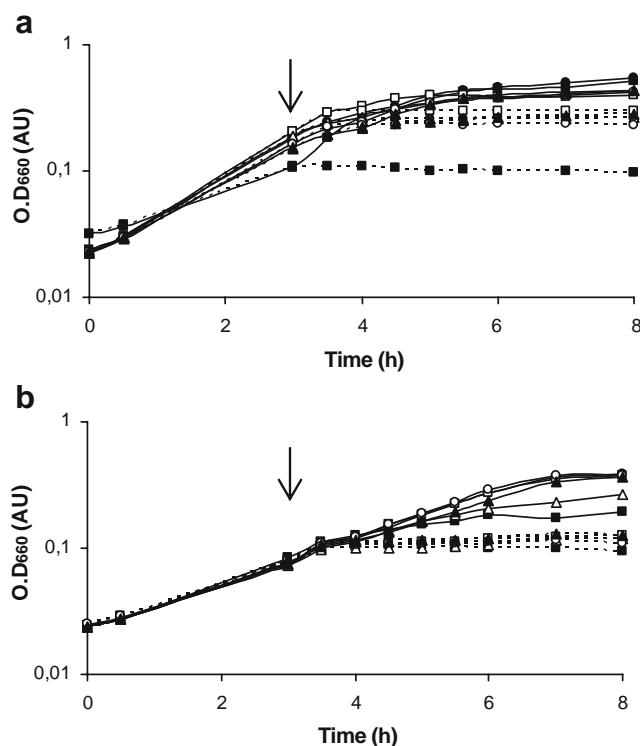


Fig. 2 Growth curves of *L. ivanovii* CIP 12510 (a) and *L. innocua* CIP 12511 (b) at 30°C (expressed in arbitrary unit of O.D₆₆₀) in LB medium (closed squares) or in LB medium supplemented by 2 g L⁻¹ of glucose (closed circles), cellobiose (closed triangles), fructose (open squares), maltose (open triangles); mannose (open circles) in presence of Mes 52A at the 1× MIC (broken line) or in absence of bacteriocin (unbroken line). Down arrow Addition of the bacteriocin. SD≤2%

acid and Lewis base. The variation in the percentage of adhesion to chloroform showed the diversity in the basic character of the two *Listeria* strains (Bellon-Fontaine et al. 1996). *L. innocua* CIP 12511 exhibited a higher affinity for basic solvent like ethyl acetate and diethyl ether than *L. ivanovii* CIP 12510, indicating a higher Lewis acid character.

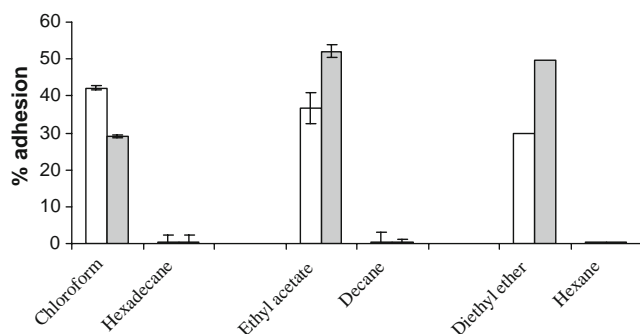


Fig. 3 Partition in organic solvents of the studied strains expressed in percentage of the initial optical density at 660 nm in the solvent. Open bars *L. ivanovii* CIP 12510, gray bars *L. innocua* CIP 12511

Impact of Mes 52A on ΔpH and $\Delta\Psi$

The impact of Mes 52A on ΔpH and $\Delta\Psi$ was determined (Table 2). Valinomycin and nigericin were used as positive references. After the addition of the bacteriocin, the fluorescence emission of BCECF-AM remained constant, indicating that Mes 52A did not perturb the ΔpH of both sensitive strains. Mes52A disrupted the membrane potential, observed by an increase of the fluorescence emission of DiSC₃(5), more so with *L. ivanovii* CIP 12510 than with *L. innocua* CIP 12511.

Impact of Mes 52A on the potassium efflux

Generally, the pore formation in a cytoplasmic membrane is accompanied by a potassium efflux (McAuliffe et al. 1998; Herranz et al. 2001a, b; Suzuki et al. 2005). Mes 52A induced a significant potassium efflux from the sensitive strain *L. innocua* CIP 12511, at 0.5× MIC or at 1× MIC (Fig. 4). However, the addition of Mes 52A did not result in any measurable potassium efflux with the sensitive strain *L. ivanovii* CIP 12510.

Penetration of Mes 52A in membrane measured by fluorescence anisotropy measurements

The effect of Mes 52A on the mobility of the phospholipids was studied by steady fluorescence anisotropy, using two types of probes (TMA-DPH and DPH) for different positions in the membrane. TMA-DPH is anchored at the water/lipid interface because of its additional charged trimethylammonium group. It reflects the packaging of the polar head group and the fluidity at the membrane surface. DPH, a hydrophobic molecule, is oriented predominantly parallel to the fatty acid chains. Its fluorescence reflects the acyl chain order in lipid bilayers and the fluidity of the core of the cytoplasmic membrane (Kuhry et al. 1983; Kuhry et al. 1985).

The fluorescence anisotropy of TMA-DPH or DPH in the two target strains in the absence of peptide was not changed, and the O.D₆₆₀ remained constant during the time of experiments.

The impact of Mes 52A on the steady fluorescence anisotropy for the membrane-incorporated fluorophore TMA-DPH and DPH was investigated (Figs. 5 and 6).

For anisotropy measurements, the final population must be 2.5×10^8 cfu mL⁻¹ to obtain reproducible responses. For *L. ivanovii* CIP 12510, a MIC value of 0.95 mg L⁻¹ for 1.6×10^7 cfu mL⁻¹ (O.D. 0.01) correspond to 14.84 mg L⁻¹ of Mes 52A for 2.5×10^8 cfu mL⁻¹. For *L. innocua* CIP 12511, a MIC value of 0.85 mg L⁻¹ corresponds to 13.28 mg L⁻¹ of Mes 52A for 2.5×10^8 cfu mL⁻¹. So anisotropy measurements were conducted with 0.5× MIC of Mes 52A to work at sublethal level or at level between 0 and 5.5× MIC.

Impact of Mes 52A on the fluidity of the surface of the cytoplasmic membrane

The initial value of TMA-DPH anisotropy was higher for *L. ivanovii* CIP 12510 (0.1909±0.0034) than for *L. innocua* CIP 12511 (0.1690±0.0069), showing that the surface of the membrane of this latter was more fluid (Fig. 5). Upon the addition of 0.5× MIC of Mes 52A, the value for anisotropy fluorescence reached a maximum after 30 or 60 min of contact time (Fig. 5a). So, the effects of Mes 52A concentration on TMA-DPH anisotropy were evaluated after 60 min of contact time (Fig. 5b). A maximal value was obtained with addition of 15 or 20 mg L⁻¹ of Mes 52A, which corresponded to a peptide/cell ratio of approximately 1.4×10^9 molecules per colony-forming unit, whereas further addition of the peptide did not change TMA-DPH anisotropy. This result can be explained by a strong insertion of the peptide at the interfacial region of the membrane of the targeted cells by adsorbing on or penetrating in the first layer.

Impact of Mes 52A on the fluidity in deep of the cytoplasmic membrane

The initial value of anisotropy of DPH was higher for *L. ivanovii* CIP 12510 (0.1570±0.0066) than for *L. innocua* CIP 12511 (0.1317±0.0034; Fig. 6), showing that the core of this latter was more fluid. Mes 52A led to a rapid

Table 2 Increase of fluorescence emission of DiSC₃(5) or of BCECF-AM expressed in percentage of the initial fluorescence normalized at 100%

Strains	Membrane potential ($\Delta\Psi$) with DiSC ₃ (5)			pH gradient (ΔpH) with BCECF-AM		
	Valinomycin	Mes 52A		Nigericin	Mes 52A	
		0.5× MIC	MIC		0.5× MIC	MIC
<i>L. ivanovii</i> CIP 12510	121±4 (A)	108±5 (B)	153±12 (A)	73±7 (A)	100±1 (B)	100±1 (B)
<i>L. innocua</i> CIP 12511	110±2 (A)	105±6 (B)	115±3 (A)	68±10 (A)	100±2 (B)	100±1 (B)

(A) Significant, (B) not significant

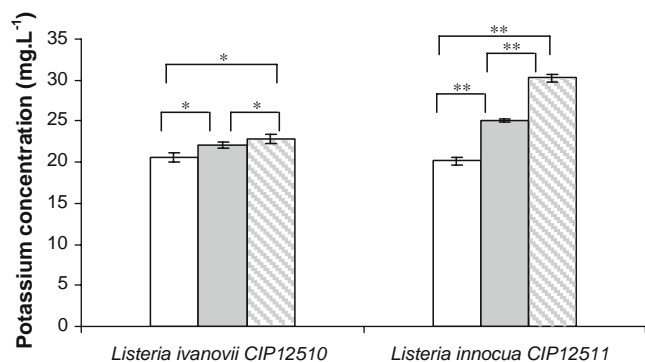


Fig. 4 Determination of the potassium concentration of the culture supernatant by atomic absorption spectrophotometry. Open bars without Mes 52A, gray bars with Mes 52A at 1/2× MIC, diagonal-shaded bars at the MIC. Analysis of variance: single asterisk no significant difference; double asterisk significant difference

increase of the anisotropy of DPH in the membrane of *L. innocua* CIP 12511 significantly after 5 min of contact with cells (Fig. 6a) and maximally in presence of 30 mg L⁻¹ Mes 52A (Fig. 6b), revealing augmented lipid acyl chain order and in keeping with intercalation of part of the peptide into the hydrocarbon region of the bilayer. These results

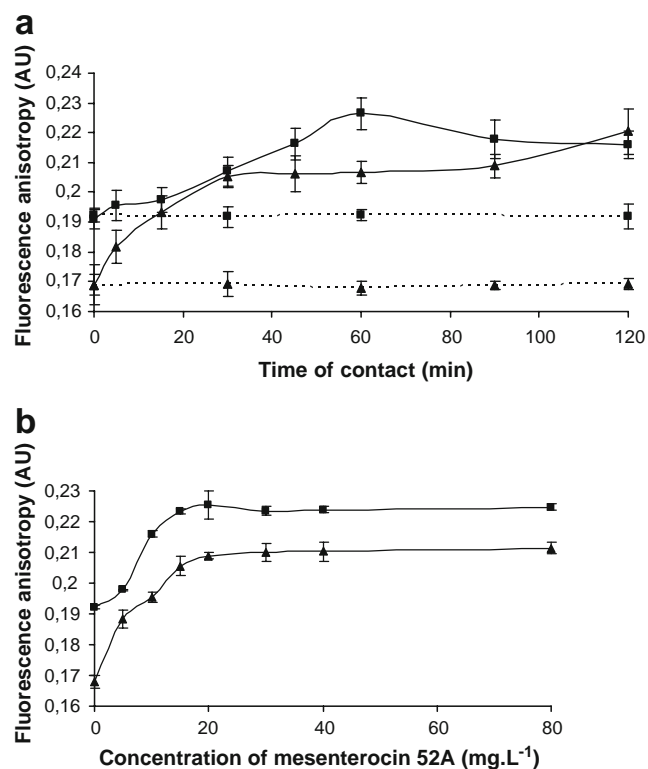


Fig. 5 Study of the fluorescence anisotropy of TMA-DPH at 30°C (in arbitrary unit, AU), in *L. ivanovii* CIP 12510 (closed squares) or in *L. innocua* CIP 12511 (closed triangles) to a final population of 2.10⁸ cfu mL⁻¹; a in function of time of contact (in minutes), with Mes 52A (1/2× MIC; solid line); without Mes 52A (dashed line); b in function of the concentration of Mes 52A. The factor of uncertainty is lower than 5%

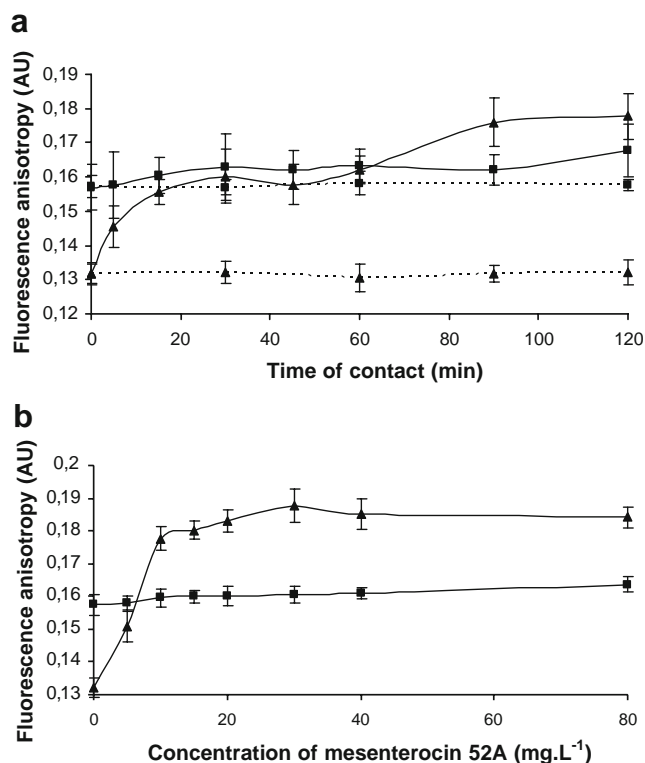


Fig. 6 Study of the fluorescence anisotropy of DPH at 30°C (in arbitrary unit, AU) in *L. ivanovii* CIP 12510 (closed squares) or in *L. innocua* CIP 12511 (closed triangles) to a final population of 2.10⁸ cfu mL⁻¹; a in function of time of contact (in min), with Mes 52A (1/2× MIC; solid line); without Mes 52A (dashed line); b in function of the concentration of Mes 52A. The factor of uncertainty is lower than 5%

suggested that the Mes 52A inserts deeply in the cytoplasmic membrane of this sensitive strain. The fluorescence anisotropy of DPH in the membrane of the sensitive *L. ivanovii* CIP 12510 strain remained constant, even after 120 min of contact time with 0.5× MIC or in presence of more than 5.5× MIC (80 mg L⁻¹ of Mes 52A), indicating that the antimicrobial peptide did not penetrate in the hydrophobic core of the membrane. However, addition of nigericin or valinomycin, used as positive reference, induced an increase of the anisotropy of TMA-DPH and DPH in the membrane of *L. ivanovii* CIP 12510 (Table 3).

Discussion

Three models describing the mechanism of action of antimicrobial peptides have been established. The “barrel-stave” model describes the formation of pores in the membrane by bundles of amphipathic α -helices and consists in four steps (Shai 1999), (1) adsorption of the peptides in α -helical structure; (2) recognition between them and the binding monomers; (3) insertion of the helix motifs into the

Table 3 Initial and maximal values of fluorescence anisotropy of TMA-DPH and DPH in *L. ivanovii* CIP 12510 after 60 min in presence of Mes 52A, nigericin or valinomycin

Conditions	TMA-DPH anisotropy (AU)			DPH anisotropy (AU)		
	Initial value	Maximal value	Variation	Initial value	Maximal value	Variation
Mes 52A, 2 μ M (7.1 mg L ⁻¹)	0.1909±0.0034	0.2264±0.0046	0.0355 (A)	0.1570±0.0066	0.1678±0.0078	0.0108 (B)
Nigericin, 50 μ M (37.3 mg L ⁻¹)	0.1891±0.0063	0.2118±0.0044	0.0227(A)	0.1562±0.0054	0.1943±0.0021	0.0381 (A)
Valinomycin, 50 μ M (55.5 mg L ⁻¹)	0.1894±0.0042	0.2108±0.0051	0.0214 (A)	0.1566±0.0048	0.2468±0.0027	0.0902 (A)

(A) Significant, (B) not significant

hydrophobic core; and (4) recruitment of additional monomers to increase the pore size. Another four-step mechanism is the “carpet” model, which describes the membrane disruption and takes place in four steps (Shai 1999; Brogden 2005), (1) preferential adsorption of the monomers to the phospholipids head group; (2) alignment of the peptides on the membrane surface; (3) rotation of the peptides for the reorientation of the hydrophobic residues toward the hydrophobic core of the membrane; and (4) disintegration of the membrane by disruption of the bilayer. The third model, described for the Gram negative bacteria, called “toroidal-model” or “wormhole” is similar to the “carpet-model” (Shai 1999). Class II bacteriocins may function by creating barrel stave-like pore or by a carpet mechanism (Moll et al. 1999). For all the models, the adsorption of the bacteriocin was the first step of the mechanism of action.

The interactions of Mes 52A with bacterial membranes of two sensitive *Listeria* strains have been investigated. Results obtained in this study indicate that Mes 52A interacts with different regions of the membrane depending on the sensitive strain used, whereas the surface of the two strains were rather hydrophilic and bipolar.

With *L. innocua* CIP 12511, addition of the peptide induced a rapid increase of the fluorescence anisotropy of the two probes DPH and TMA-DPH, which suggests that the Mes 52A interacts both on the surface and within the phospholipid bilayer. These results support the hypothesis that the bacteriocin could insert into the cytoplasmic membrane to form pores. The measurement of the potassium efflux is in accordance with the degree of penetration of Mes 52A. A K⁺ efflux was only present with the strain for which the fluorescence anisotropy of DPH has been changed. So, a penetration deep into membrane is correlated with a pore formation. Mes 52A has an impact on the membrane functioning. The bacteriocin does not disrupt the pH gradient but has a significant impact on the membrane potential of this sensitive strain. Modification of $\Delta\Psi$ has been already described with others class IIa bacteriocins like enterocin P (Herranz et al. 2001a, b) or piscicocin CS526 (Suzuki et al. 2005).

In *L. ivanovii* CIP 12510, Mes 52A interacts only with the first layer of the cytoplasmic membrane. Indeed, only

the fluorescence anisotropy of TMA-DPH was modified; the fluorescence anisotropy of DPH was constant in spite of the addition of a significant quantity of the bacteriocin (5.5× MIC). No significant potassium efflux was measured. These results suggest that Mes 52A can interact with the surface without penetration into the membrane bilayer. For *L. ivanovii* CIP 12510, in spite of the absence of pore formation and of potassium efflux, Mes 52A has an important impact on the membrane potential suggesting an influence on the ion membrane transport system by only the adsorption of the peptide on the membrane. The penetration of Mes 52A only on the surface of the membrane is in accordance with previous results obtained with MesY105 and an artificial liposome (Castano et al. 2005). In fact, in situ infrared data showed that MesY105 binding only affects the polar head group vibrations, while the lipid order of the acyl chains remains unaffected.

These two different mechanisms of action could be explained by the presence or absence of receptors on the membrane of the sensitive strain. The mannose permease is the first receptor described which could be important for the recognition of the targeted cell (Dalet et al. 2000; Dalet et al. 2001; Hechard et al. 2001). The impact of further glucids on the efficiency of MesY105 has been determined. Glucose or mannose in the culture media increased the efficiency of the MesY105, whereas with cellobiose, the sensitive *Listeria* was not affected by the bacteriocin (Dalet et al. 2001). In our conditions, there was no significant difference in Mes 52A susceptibility in the presence or absence of mannose compared with the same medium without a carbon source for the two strains, *L. ivanovii* CIP 12510 and *L. innocua* CIP 12511, suggesting no difference in level of mannose permease expression.

It is for the first time demonstrated that one class IIa bacteriocin, i.e., Mes 52A, can act by two different mechanisms of action depending on the targeted strain. A three-step mechanism of action (adsorption, penetration, and pore formation) on the basis of the barrel-stave model (Shai 1999) is involved for *L. innocua* CIP 12511. A one-step mechanism based only on the adsorption and the disruption of the membrane functioning like the carpet model without penetration in the membrane is involved for

L. ivanovii CIP 12510. The adsorption of the peptide on the bacterial surface is sufficient to obtain an antibacterial action. For the two sensitive strains tested, the addition of the peptide provokes an immediate change of the membrane potential, whereas the anisotropy of fluorescence of the DPH increases only after 5 min of contact for *L. innocua* CIP 12511. The adsorption could provoke the disruption of the membrane functioning via dissipation of the $\Delta\Psi$, and the pore formation could be just a consequence, not the reason, of the bacteriostatic effect observed.

Acknowledgements We thank Michèle Turban and Delphine Roger for excellent technical assistance.

References

- Bellon-Fontaine MN, Rault J, van Oss CJ (1996) Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* 7:47–53
- Bokas D, Uy D, Grattepanche F, Duportail G, Guedon E, Delaunay S, Goergen JL (2007) Cell envelope fluidity modification for an effective glutamate excretion in *Corynebacterium glutamicum* 2262. *Appl Microbiol Biotechnol* 76:773–781
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Brogden KA (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 3:238–250
- Castano S, Desbat B, Delfour A, Dumas JM, da Silva A, Dufourcq J (2005) Study of structure and orientation of mesentericin Y105, a bacteriocin from Gram-positive *Leuconostoc mesenteroides*, and its Trp-substituted analogues in phospholipid environments. *Biochim Biophys Acta* 1668:87–98
- Dalet K, Briand C, Cenatiempo Y, Hechard Y (2000) The rpoN gene of *Enterococcus faecalis* directs sensitivity to subclass IIa bacteriocins. *Curr Microbiol* 41:441–443
- Dalet K, Cenatiempo Y, Cossart P, Hechard Y (2001) A sigma(54)-dependent PTS permease of the mannose family is responsible for sensitivity of *Listeria monocytogenes* to mesentericin Y105. *Microbiology* 147:3263–3269
- Fimland G, Johnsen L, Dalhus B, Nissen-Meyer J (2005) Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. *J Pept Sci* 11:688–696
- Fimland G, Pirneskoski J, Kaewsrichan J, Jutila A, Kristiansen PE, Kinnunen PK, Nissen-Meyer J (2006) Mutational analysis and membrane-interactions of the beta-sheet-like N-terminal domain of the pediocin-like antimicrobial peptide sakacin P. *Biochim Biophys Acta* 1764:1132–1140
- Fleury Y, Dayem MA, Montagne JJ, Chaboisseau E, Le Caer JP, Nicolas P, Delfour A (1996) Covalent structure, synthesis, and structure–function studies of mesentericin Y 105(37), a defensive peptide from gram-positive bacteria *Leuconostoc mesenteroides*. *J Biol Chem* 271:14421–14429
- Fregeau Gallagher NL, Sailer M, Niemczura WP, Nakashima TT, Stiles ME, Vederas JC (1997) Three-dimensional structure of leucocin A in trifluoroethanol and dodecylphosphocholine micelles: spatial location of residues critical for biological activity in type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biochemistry* 36:15062–15072
- Hechard Y, Sahl HG (2002) Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie* 84:545–557
- Hechard Y, Derijard B, Letellier F, Cenatiempo Y (1992) Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *J Gen Microbiol* 138(Pt 12): 2725–2731
- Hechard Y, Pelletier C, Cenatiempo Y, Frere J (2001) Analysis of sigma(54)-dependent genes in *Enterococcus faecalis*: a mannose PTS permease (EII(Man)) is involved in sensitivity to a bacteriocin, mesentericin Y105. *Microbiology* 147:1575–1580
- Herranz C, Cintas LM, Hernandez PE, Moll GN, Driessen AJ (2001a) Enterocin P causes potassium ion efflux from *Enterococcus faecium* T136 cells. *Antimicrob Agents Chemother* 45:901–904
- Herranz C, Chen Y, Chung HJ, Cintas LM, Hernandez PE, Montville TJ, Chikindas ML (2001b) Enterocin P selectively dissipates the membrane potential of *Enterococcus faecium* T136. *Appl Environ Microbiol* 67:1689–1692
- Klaenhammer TR (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 12:39–85
- Kuhry JG, Duportail G, Bronner C, Laustriat G (1985) Plasma membrane fluidity measurements on whole living cells by fluorescence anisotropy of trimethylammoniumdiphenylhexatriene. *Biochim Biophys Acta* 845:60–67
- Kuhry JG, Fonteneau P, Duportail G, Maechling C, Laustriat G (1983) TMA-DPH: a suitable fluorescence polarization probe for specific plasma membrane fluidity studies in intact living cells. *Cell Biophys* 5:129–140
- Mathieu F, Suwandhi IS, Rekhif N, Milliere JB, Lefebvre G (1993) Mesentericin 52, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* FR 52. *J Appl Bacteriol* 74:372–379
- McAuliffe O, Ryan MP, Ross RP, Hill C, Breeuwer P, Abee T (1998) Lactacin 3147, a broad-spectrum bacteriocin which selectively dissipates the membrane potential. *Appl Environ Microbiol* 64:439–445
- Molenaar D, Abee T, Konings WN (1991) Continuous measurement of the cytoplasmic pH in *Lactococcus lactis* with a fluorescent pH indicator. *Biochim Biophys Acta* 1115:75–83
- Moll GN, Konings WN, Driessen AJ (1999) Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76:185–198
- Papo N, Shai Y (2003) Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes. *Peptides* 24:1693–1703
- Revol-Junelles AM, Mathis R, Krier F, Fleury Y, Delfour A, Lefebvre G (1996) *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 synthesizes two distinct bacteriocins. *Lett Appl Microbiol* 23:120–124
- Shai Y (1999) Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta* 1462:55–70
- Suzuki M, Yamamoto T, Kawai Y, Inoue N, Yamazaki K (2005) Mode of action of piscicocin CS526 produced by *Carnobacterium piscicola* CS526. *J Appl Microbiol* 98:1146–1151
- Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW (1976) Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev* 40:722–756
- Verheul A, Russell NJ, Van THR, Rombouts FM, Abee T (1997) Modifications of membrane phospholipid composition in nisin-resistant *Listeria monocytogenes* Scott A. *Appl Environ Microbiol* 63:3451–3457
- Zhao H, Sood R, Jutila A, Bose S, Fimland G, Nissen-Meyer J, Kinnunen PK (2006) Interaction of the antimicrobial peptide pheromone Plantaricin A with model membranes: implications for a novel mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* 1758:1461–1474

I.3 Contribution de l'article

L'addition de la méSENTÉROCINE 52A à la concentration minimale inhibitrice (CMI) dans les cultures des deux souches de *Listeria sp.* provoque un effet bactériostatique. Cependant, la durée de cet effet est différente selon la souche considérée. Pour *L. ivanovii* CIP 12510, une reprise de croissance est observée après seulement 10 h de contact avec la bactériocine, tandis que pour *L. innocua* CIP 12511 cette reprise est observée après 30 h. De plus, en présence d'une concentration équivalente à deux fois la CMI, l'effet bactériostatique sur *L. innocua* CIP 12511 se prolonge jusqu'à 48 h.

Cette différence de comportement est peut-être due à la présence d'un récepteur de la méSENTÉROCINE 52A ou à une différence du niveau d'expression de celui-ci. Ce récepteur pourrait faire partie de la famille des mannose-perméases. Pour vérifier cette hypothèse, l'influence de glucides, notamment le mannose, sur la sensibilité des deux souches de *Listeria sp.* à la méSENTÉROCINE 52A a été étudiée. Aucun des glucides testés n'a d'effet sur la sensibilité des deux *Listeria sp.* à la bactériocine. Cependant, ces résultats préliminaires ne remettent pas en cause l'existence d'un récepteur.

Pour comprendre cette différence entre les deux souches, la caractérisation des propriétés physico-chimiques de leur membrane a été abordée ainsi que l'étude du mécanisme d'action de la méSENTÉROCINE 52A.

Les deux souches possèdent une affinité aussi bien pour les solvants acides selon Lewis que pour les solvants basiques selon Lewis soulignant ainsi leur caractère bipolaire. Cependant, *L. innocua* CIP 12511 présente une plus grande affinité pour les solvants basiques que *L. ivanovii* CIP 12510. Ceci suggère un caractère acide de Lewis plus marqué pour *L. innocua* CIP12511.

La mesure de l'anisotropie de fluorescence montre également une différence entre les deux souches. La sonde TMA-DPH se localise dans les têtes polaires des phospholipides ; l'addition de la méSENTÉROCINE 52A provoque une augmentation de l'anisotropie de fluorescence de cette sonde ce qui traduit une augmentation de la rigidité à la surface de la membrane cytoplasmique. Cette augmentation de la rigidité est probablement due à l'adsorption de la bactériocine sur les têtes polaires, voire à une pénétration partielle du peptide dans la membrane. La sonde DPH se localise au niveau des chaînes d'acides gras. L'addition de la bactériocine provoque une augmentation de la rigidité au cœur de la membrane mais seulement dans le cas de *L. innocua* CIP 12511. Pour *L. ivanovii* CIP 12510 aucune augmentation de l'anisotropie de fluorescence du DPH n'est observée, même en

présence de fortes concentrations en méésentéroïne 52A. Ce résultat va à l'encontre de la formation d'un pore à travers la membrane. En effet, les modèles établis supposent que la bactériocine traverse de part en part la membrane cytoplasmique pour y former un pore. L'insertion partielle de la méésentéroïne Y105 a été également décrite sur un modèle artificiel, un liposome (Castano *et al.*, 2005).

La formation d'un pore se traduit généralement par la fuite de composés vitaux tels que le potassium. Pour *L. innocua* CIP 12511, l'addition de la bactériocine provoque une fuite de cet élément ; ce phénomène n'est pas observé chez *L. ivanovii* CIP12510 même à la concentration minimale inhibitrice.

La méésentéroïne 52A induit une dissipation du potentiel de membrane de manière plus marquée pour la souche *L. ivanovii* CIP 12510 mais pas du gradient de pH et ceci pour les deux souches étudiées.

Ce travail a permis de montrer la possibilité de deux mécanismes d'action pour la méésentéroïne 52A. Le premier, mis en jeu en présence de *L. ivanovii* CIP 12510, consisterait uniquement en l'adsorption du peptide sur la membrane selon le modèle « *Carpet* » (Shai 1999 ; Brogden 2005). Cette fixation provoquerait un dysfonctionnement de la membrane se traduisant par une dissipation du potentiel de membrane. Le second, se produisant en présence de *L. innocua* CIP 12511, consisterait en la pénétration de la bactériocine dans la profondeur de la membrane se traduisant par la formation d'un pore (Shai 1999 ; Brogden 2005), provoquant une fuite de composés vitaux tels que le potassium. La formation du pore peut être aussi une conséquence et non pas la cause de l'effet bactériostatique observé.

II. Différences fonctionnelles entre des souches de *Leuconostoc sp.* sensibles ou résistantes à la mésentéroïcine 52A, une bactériocine de la sous-classe IIa

I.1 Introduction

L'émergence de souches résistantes vis-à-vis des bactériocines est un problème récurrent qui limite l'utilisation de ces peptides en tant que conservateur en industrie agro-alimentaire. Tout comme les mécanismes d'action des peptides antibactériens, les mécanismes de résistance sont complexes. La résistance de souches de *Listeria* vis-à-vis de la nisine a été particulièrement étudiée. Cette perte de sensibilité est due à plusieurs modifications (Crandall *et al.*, 1998) telles que le changement de composition du peptidoglycane, la variation de la fluidité de la membrane cytoplasmique (Vadyvaloo *et al.*, 2002 ; Naghmouchi *et al.*, 2006) et/ou la modification de la charge de cette dernière. D'autres mécanismes de résistance à la nisine ont été suggérés chez *Lc. lactis*. Cette espèce pourrait piéger le peptide au niveau de sa paroi afin d'éviter son adsorption sur la membrane. Des systèmes de transports actifs éliminant la nisine de la membrane ont également été mis en évidence (Kramer *et al.*, 2006). Des mécanismes de résistance aux bactériocines de la sous-classe IIa similaires ont été décrits chez *E. faecium* (Sakayori *et al.*, 2003). Une modification d'un récepteur pourrait conférer une certaine insensibilité aux souches ainsi mutées (Gravesen *et al.*, 2000 ; Gravesen *et al.*, 2002b).

L'interaction de la mésentéroïcine 52A avec la membrane a été étudiée chez trois souches de *Leuconostoc sp.* présentant différents niveaux de sensibilité ou de résistance. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* LMA 7 est sensible à cette bactériocine. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* LMA 7AR a été rendu résistant à cette bactériocine lors d'une précédente étude (Limonet *et al.*, 2002 ; Limonet *et al.*, 2004a). Enfin, *Ln. citreum* CIP 103405 est naturellement insensible à cette bactériocine.

La surface de ces souches a été caractérisée en mesurant leur affinité pour des solvants organiques.

La pénétration de la bactériocine a été ensuite déterminée en mesurant l'anisotropie de fluorescence des deux sondes, le DPH et le TMA-DPH, utilisées lors de l'étude précédente. Les conséquences de l'interaction de la bactériocine avec la membrane cytoplasmique de la cellule cible sur la force protomotrice (potentiel membranaire et gradient de proton) et les fuites de potassium ont été étudiées.

Les résultats obtenus ont été mis en corrélation avec les résultats précédemment publiés par l'équipe sur la composition en acides gras et en phospholipides de la membrane des souches de *Leuconostoc* sp. sélectionnées.

II.2 “Functional differences in *Leuconostoc* sensitive and resistant strains to mesenterocin 52A, a class IIa bacteriocin”

RESEARCH LETTER

Functional differences in *Leuconostoc* sensitive and resistant strains to mesenterocin 52A, a class IIa bacteriocin

Jordane Jasniewski¹, Catherine Cailliez-Grimal¹, Mohamed Younsi², Jean-Bernard Millière¹ & Anne-Marie Revol-Junelles¹

¹Laboratoire de Science et Génie Alimentaires, Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy-Université, Vandoeuvre-lès-Nancy, France; and

²Laboratoire de Nutrition et Maladies Métaboliques-EA 3446, Faculté de Médecine, Nancy-Université, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Correspondence: Anne-Marie Revol-Junelles, Laboratoire de Science et Génie Alimentaires, Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy-Université, 2 avenue de la Forêt de Haye, BP 172, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France. Tel.: +33 0 3 83 59 58 84; fax: +33 0 3 83 59 57 71; e-mail: anne-marie.revol@ensaia.inpl-nancy.fr

Abstract

Mesenterocin 52A (Mes 52A) is a class IIa bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* FR52. The interaction of Mes 52A with bacterial membranes of sensitive, resistant and insensitive *Leuconostoc* strains has been investigated. The degree of insertion of Mes 52A on the phospholipid bilayer was studied by fluorescence anisotropy measurements using two probes, 1-(4-trimethylammonium)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene (TMA-DPH) and DPH, located at different positions in the membrane, and the consequence for K⁺ efflux and proton motive force was analyzed. Mes 52A caused an increase in the fluorescence of TMA-DPH and DPH in the membrane of the sensitive strain *L. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* LMA 7, indicating that Mes 52A inserts into the cytoplasmic membrane of this sensitive strain. This insertion leads to K⁺ efflux, without perturbation of ΔpH and a weak modification of ΔΨ, and is consistent with pore formation. With the high-level resistant strain *L. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* LMA 7AR, or with the insensitive strain *Leuconostoc citreum* CIP 103405, no modification of TMA-DPH or DPH anisotropy occurred, even in the presence of high Mes 52A levels. The membrane potential was not modified and no K⁺ efflux was detected. There is a clear correlation between the physico-chemical characteristics of the membrane, the degree of Mes 52A penetration, the mechanism of action and the resistance or insensitivity characteristic of the target strains.

Keywords

bacteriocin; anisotropy; antibacterial peptide.

Introduction

Bacteriocins of lactic acid bacteria have potential for interesting industrial applications. Four classes of bacteriocins have been defined on the basis of their genetic and biochemical characteristics (Klaenhammer, 1993). Among them, class I (lantibiotics) and class II are the most studied.

Leuconostoc is an important producer synthesizing several bacteriocins of class II. *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* FR52 produced two bacteriocins: mesenterocin 52A (Mes 52A) and mesenterocin 52B (Mes 52B) (Revol-Junelles *et al.*, 1996). Mes 52B is a 32-amino-acid class IIc peptide, identical to mesenterocin B105 produced by *L. mesenteroides* Y105 (Hechard *et al.*, 1999), which displays a narrow spectrum of activity limited to the genera *Leuconostoc* and *Weissella*. Mes 52A is a class IIa bacteriocin

identical to mesentericin Y105 (MesY105). These two bacteriocins are highly similar to leucocin A, with two amino acid residues difference between their sequence (Hechard *et al.*, 1992; Revol-Junelles *et al.*, 1996). Circular dichroism data of MesY105 in a buffer solution indicated that the N-terminal domain is capable of involvement in interaction with a putative receptor while the α-helix from residues 17 to 31 allows lipid binding to the membrane (Fleury *et al.*, 1996).

Some susceptible strains are known to develop bacteriocin resistance. The resistant mechanism appears to be complex and might be a critical problem when bacteriocins are used as biopreservatives. The nisin resistance of *Listeria* strains is well documented. In 1998, Crandall & Montville (1998) put forward a model for this resistance that included three factors: (1) variation of peptidoglycan composition

(Maisnier-Patin & Richard, 1996); (2) modification of the electric charge of the membrane by phospholipid content changes, thereby preventing pore formation (Ming & Daeschel, 1993; Verheul *et al.*, 1997; Crandall & Montville, 1998); and (3) increase in membrane rigidity, preventing peptide insertion and association (Ming & Daeschel, 1993). More recently, it has been shown that four major mechanisms are implicated in *Lactococcus lactis* resistance to nisin (Kramer *et al.*, 2006). This includes (1) preventing nisin from reaching the cytoplasmic membrane, (2) reducing the acidity of the extracellular medium, thereby stimulating the binding of nisin to the cell wall, (3) preventing the insertion of nisin into the membrane and (4) possibly transporting nisin across the membrane or extruding nisin out of the membrane. Similar results were obtained with some class IIa bacteriocins. The changes in membrane components in two *Enterococcus faecium* mutants resistant to mundticin KS were similar to those in nisin-resistant strains and involved fatty acid and phospholipid modifications leading to a more rigid and less anionic membrane (Sakayori *et al.*, 2003). The resistance of *Listeria monocytogenes* LSD 530 to divergicin M35 seems to be due to modification in the fatty acid composition enhancing membrane rigidity, rather than protein modification (Naghmouchi *et al.*, 2006). In contrast to these findings, *L. monocytogenes* B73- and 412-resistant strains to leucocin A have a more fluid membrane (Vadyvaloo *et al.*, 2002). Some protein modifications, revealed using two-dimensional gel electrophoresis of whole cells, were observed in a *L. monocytogenes* P strain resistant to divercin V41 (Duffes *et al.*, 2000). Interruption of different genes encoding σ^{54} , or a σ^{54} -associated activator or two subunits of $\text{EII}_t^{\text{Man}}$, a phosphotransferase system (PTS) permease of the mannose family, led to resistance of *L. monocytogenes* to Mes Y105 (Dalet *et al.*, 2001; Gravesen *et al.*, 2002). The σ^{54} factor (Dalet *et al.*, 2000) or $\text{EII}_t^{\text{Man}}$ (Hechard *et al.*, 2001) were also implicated in Mes Y105 resistance in *Enterococcus faecalis* JH2-2. The intermediate resistance of *E. faecalis* JH2-2 to divercin V41 was associated with three genes encoding σ^{54} factor, a glycerophosphoryl diester phosphodiesterase and a protein with a putative phosphodiesterase function (Calvez *et al.*, 2007).

In previous studies, we have investigated the changes in the membrane composition and in the cell wall of *Leuconostoc* strains associated with insensitivity and resistance to Mes 52A and Mes 52B. The model was made with the two bacteriocins and eight target strains from the genera *Leuconostoc* and *Weissella*, which were insensitive or had been made resistant to one mesenterocin. We observed that Mes 52A and Mes 52B resistance is unlikely to be due to changes in membrane fatty acid composition (Limonet *et al.*, 2002). Resistant strains displayed some cell morphology modifications, a large degree of increase in antibiotic

resistance and modifications in lysozyme susceptibility. Moreover, Mes 52A-resistant strains displayed modifications in their membrane phospholipids, leading to a less anionic membrane (Limonet *et al.*, 2002, 2004). It was concluded that a sum of minor physiological characteristics of the membrane and/or the cell wall was probably involved in insensitivity/resistance mechanisms limiting bacteriocin diffusion through the cell wall and interaction with and penetration of the cell membrane.

In this study, we characterize the resistance or insensitivity of some *Leuconostoc* strains to extend the knowledge on resistance mechanisms developed by *Leuconostoc* strains. The model was simplified and limited to one bacteriocin, i.e. Mes 52A, only two wild-type strains from *Leuconostoc* genus chosen for their sensitivity or insensitivity to Mes 52A and one high-level resistant strain to Mes 52A. The interaction and penetration of the peptide with the viable cell membranes of these *Leuconostoc* strains were studied by fluorescence anisotropy using two probes located at different positions in the membrane: 1-(4-trimethylammonium)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene (TMA-DPH) and DPH. Subsequently, the influence of Mes 52A on potassium efflux, on $\Delta\Psi$ and ΔpH was determined.

Materials and methods

Bacterial strains and culture conditions

Leuconostoc citreum CIP 103405 was obtained from the public collection [Collection de l'Institut Pasteur (CIP), Paris, France] and *L. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* LMA 7 from our own collection [Laboratoire de Microbiologie Alimentaire (LMA) ENSAIA-INPL, Nancy, France]. The resistant strain, *L. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* LMA 7AR, was obtained in a previous work (Limonet *et al.*, 2002). These strains were stored at $-24\text{ }^\circ\text{C}$ without prior growth. Before use, strains were cultured twice in Man-Rogosa-Sharp (MRS) broth (Biokar, Beauvais, France) at $30\text{ }^\circ\text{C}$ for 16 h. Agar medium was prepared by addition of 15 g L^{-1} of bacteriological agar type A (Biokar).

Chemicals, bacteriocin and fluorescent probes

Mes 52A was obtained by chemical synthesis (Synt:em, Nimes, France) at 90–95% of purity according to the published sequence. This bacteriocin (220 mg L^{-1}) was prepared in a phosphate buffer (5 mM, pH 6.5). The protein concentration was checked using the Bradford method (Bradford, 1976; Revol-Junelles *et al.*, 1996).

The fluorescent probe TMA-DPH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was prepared in *N,N*-dimethylformamide to a final concentration of 2 mM. The DPH probe [DPH (Sigma-Aldrich) was prepared in tetrahydrofurane] to a final concentration of 2 mM.

Nigericin and valinomycin (Sigma-Aldrich) were prepared in chloroform or in dimethylsulfoxide, respectively, to a final concentration of 10 mM. The $\Delta\Psi$ of the two strains was measured qualitatively with the fluorescent probe 3,3'-dipropylthiadicarbocyanine iodide [DiSC₃(5)] (Sigma-Aldrich). The Δ pH was measured with the fluorescent probe 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5[and 6]-carboxyfluorescein acetoxymethyl ester (BCECF AM) (Sigma-Aldrich).

Determination of antibacterial activity

The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined by the critical dilution method in 96-well plates (Nunc, Roskilde, Denmark) (Verheul *et al.*, 1997). Mes 52A was prepared in the phosphate buffer. The target strains were prepared in MRS agar medium to a final OD_{660 nm} of 0.01. The plates were shaken (Titramax 100, Bioblock Fisher Scientific, Illkirch, France), and the initial OD_{660 nm} was determined with a Titertek Multiscan MCC/340 (Huntsville, AL). The plates were incubated for 24 h at 30 °C. The MIC value (mg L⁻¹) is the inverse of the highest dilution where no growth is detected.

The minimal bactericidal concentration (MBC) was determined by subculturing each of the no-growth plates in the above MIC test to a solid medium that did not contain Mes 52A. The MBC is identified as the smallest concentration of peptide that prevents any growth of the test bacterium.

Evaluation of bacterial surface hydrophobicity and Lewis acid–base character

The microbial adhesion to solvents (MATS) method was used for the evaluation of the hydrophobic/hydrophilic cell surface properties of the strains and their Lewis acid–base characteristics. The polar solvent could be an electron acceptor or an electron donor, and was compared with a nonpolar solvent that exhibited similar van der Waals surface tension components (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996). The following pairs of solvents were selected: chloroform, an electron acceptor solvent, and hexadecane, a nonpolar solvent; ethyl acetate, an electron donor solvent, and decane, a nonpolar solvent; and diethyl ether, an electron donor, and hexadecane, a nonpolar solvent.

A microbial suspension containing 10⁸ CFU mL⁻¹ in 2.4 mL of 1.5 × 10⁻¹ M NaCl was vortexed for 90 s with 0.4 mL of a solvent. The mixture was allowed to stand for 15 min to ensure that the two phases were separated completely before a sample (1 mL) was removed carefully from the aqueous phase, and the OD_{660 nm} was determined. The percentage of cells present in each solvent was subsequently calculated using the equation: %Affinity = (100 × A)/A₀, where A₀ is the OD_{660 nm} of the

bacterial suspension before mixing and A is the OD after mixing. Each experiment was performed in triplicate using three independently prepared cultures.

Measurement of the anisotropy of fluorescence

The strains were cultivated in 50 mL of MRS medium for 16 h at 30 °C. The bacterial cells were harvested by centrifugation (10 000 g at 4 °C for 15 min) and washed three times with the anisotropy buffer [Na₂HPO₄, 3 g L⁻¹; KH₂PO₄, 6 g L⁻¹; NaCl, 2 g L⁻¹; and (NH₄)₂SO₄, 8 g L⁻¹, pH 7.6]. Cell pellets, suspended in the same buffer to obtain a final concentration of around 2 × 10⁸ CFU mL⁻¹, were stored at -30 °C.

The experiments were carried out in the dark to preserve fluorescent probes. The fluorescence anisotropy measurements of cells labelled with DPH or TMA-DPH were carried out using a T-format continuous excitation device (Fluofluorimeter, Regulest, Florange, France). The intensities were also measured on blank samples (unlabelled cells) for correction (Kuhry *et al.*, 1983, 1985). The samples were preincubated at 30 °C (Thermoblock, FALC, Treviglio, Italy). A diluted cell suspension (3 mL) in a quartz cuvette was labelled with 3 μL of TMA-DPH or DPH solution for 7 or 30 min, respectively (Bokas *et al.*, 2007). Mes 52A was added to a final concentration equivalent to 1/2 MIC (19 mg L⁻¹ for 2 × 10⁸ CFU mL⁻¹) and the suspensions were incubated for 0, 5, 15, 30, 45, 60, 90 or 120 min. The influence of the concentration of Mes 52A was determined after 60 min of contact with a final concentration of peptide equal to 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40 and 80 mg L⁻¹. The excitation and emission wavelengths were 365 and 425 nm, respectively.

During all the determinations of the fluorescence anisotropy, the cytoplasmic membrane of the studied strain was saturated with the probe; the intensity of fluorescence was constant. A control of the fluorescence anisotropy without bacteriocin was realized during the experiment; the initial fluorescence anisotropy was constant during 2 h. Without cells, in the polar solvent used, no photon emission by the probes was detected.

The temperature of the labelled and blank samples was controlled rigorously during the measurement, and the anisotropy was measured at the culture temperature (30 °C). Five measurements were performed for each sample with five repetitions. The fluorescence anisotropy $\langle r \rangle$ was calculated as described (Kuhry *et al.*, 1983, 1985).

To evaluate the stability of the cells during the anisotropy experiments, anisotropy buffer was inoculated with a 16-h subculture of the different strains in order to reach 10⁴ CFU mL⁻¹. Mes 52A was added (1 × MIC final concentration) to the cultures, and enumerations were performed after 0, 20 and 60 min of incubation at 30 °C, using a spiral

plating (Whitley Automatic Spiral Plater, WASP 2, AES Laboratoire, Combourg, France).

Measurement of ΔpH and $\Delta\Psi$

Cells were harvested in the log growth phase ($\text{OD}_{660\text{ nm}} = 0.6$), washed twice with ice-cold 50 mM HEPES buffer containing 0.6 mM of KCl, glucose 0.2%, adjusted at pH 7.0 with KOH 40%, resuspended in the same buffer to 1/100 of their initial volume and stored on ice.

The $\Delta\Psi$ was measured qualitatively with the fluorescent probe DiSC₃(5) (Sigma-Aldrich). Glucose-energized cells (to a final population of 2.5×10^8 CFU mL⁻¹) were added to a quartz cuvette containing HEPES buffer and DiSC₃(5) (5 μM). Next, after 3 min of incubation with nigericin (1.5 nM), which dissipates the pH gradient (ΔpH), Mes 52A (1* MIC) or valinomycin (1.5 nM) was added. Fluorescence measurements were performed using a spectrofluorometer FLX (Safas-Monaco, Monaco) at 622 and 670 nm for excitation and emission, respectively (Herranz *et al.*, 2001a, b).

The ΔpH was measured using an acid shock (Molenaar *et al.*, 1991). Glucose-energized, BCECF-AM-loaded cells (final population of 2.5×10^8 CFU mL⁻¹) were added to a stirred cuvette containing 50 mM phosphate buffer, pH 6.0. Then, after 3 min of incubation with valinomycin (1.5 nM), which dissipates the $\Delta\Psi$, Mes 52A (1* MIC) or nigericin (1.5 nM) was added. Fluorescence was measured at 482 and 528 nm for excitation and emission, respectively. All measures were determined in triplicate.

Effect of the Mes 52A on potassium efflux

Stationary phase cells were harvested by centrifugation (10 000 g at 4 °C for 15 min). The pellets were washed three times with tryptone-salt (TS) (0.9%) supplemented with glucose (1%). Cells were resuspended in TS-glucose to a final population of 2.5×10^8 CFU mL⁻¹. Mes 52A or the same volume of buffer without the peptide was added to a final concentration corresponding to 1/2 and 1 MIC. Cells were incubated with Mes 52A for 60 min at 30 °C. The cells were harvested by centrifugation (10 000 g at 4 °C for 15 min), and the concentration of the potassium of the supernatant was determined using the atomic absorption spectrophotometer 1100 (Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France).

Statistical analysis

All results were analyzed using ANOVA (Excel, Microsoft) with a model including one effect (time of contact, concentration of Mes 52A).

Results

The activity of Mes 52A was quantified in terms of MICs and MBCs. *Leuconostoc mesenteroides* LMA 7 exhibited a MIC value of 0.48 mg L⁻¹ (124 nM), with an MBC value higher than 500 mg L⁻¹. The MIC of *L. mesenteroides* LMA 7AR and *L. citreun* CIP 103405 were higher than 2000 mg L⁻¹ (516 μM). These two strains were qualified as resistant and insensitive to Mes 52A, respectively.

Impact of Mes 52A on the fluidity of the cytoplasmic membrane

The effect of Mes 52A on the mobility of the phospholipids was studied by steady fluorescence anisotropy, using two types of probes (TMA-DPH and DPH) located at different positions in the membrane. TMA-DPH is anchored at the water/lipid interface, because of its additional charged trimethylammonium group. It reflects the packaging of the polar head group and, thus, the fluidity at the membrane surface. DPH, a hydrophobic molecule, is oriented predominantly parallel to the fatty acid chains. Its fluorescence reflects the acyl chain order in lipid bilayers, and the fluidity of the core of the cytoplasmic membrane (Kuhry *et al.*, 1983, 1985).

The fluorescence anisotropy of TMA-DPH or DPH in the three target strains in the absence of peptide was not varied during the experiments (data not shown). The initial value of TMA-DPH anisotropy was higher for *L. mesenteroides* LMA 7AR (0.2001 ± 0.0005) compared with the sensitive strain *L. mesenteroides* LMA 7 (0.1785 ± 0.0022), indicating that the membrane surface of the latter was more rigid (Fig. 1a). The initial value of DPH anisotropy was similar for the three strains, indicating the same fluidity in the core of the membrane for all the strains tested (Fig. 2b). The addition of Mes 52A led to a rapid increase of the anisotropy of TMA-DPH and DPH in the membrane of *L. mesenteroides* LMA 7, maximal in the presence of 10 mg L⁻¹ Mes 52A (Figs 1b and 2b), revealing an augmented lipid acyl-chain order, and in keeping with intercalation of part of the peptide into the hydrocarbon region of the bilayer. These results suggest that the Mes 52A inserts deeply into the cytoplasmic membrane of this sensitive strain. The fluorescence anisotropy of TMA-DPH and DPH in the membrane of the resistant and insensitive strains remained constant, whatever the concentration of Mes 52A added, indicating that the antimicrobial peptide did not penetrate into the first layer and into the hydrophobic core of the membrane.

Impact of Mes 52A on potassium efflux, ΔpH and $\Delta\Psi$

Mes 52A induced a significant potassium efflux from the sensitive strain, at 1/2* MIC or at 1* MIC (Fig. 3). However,

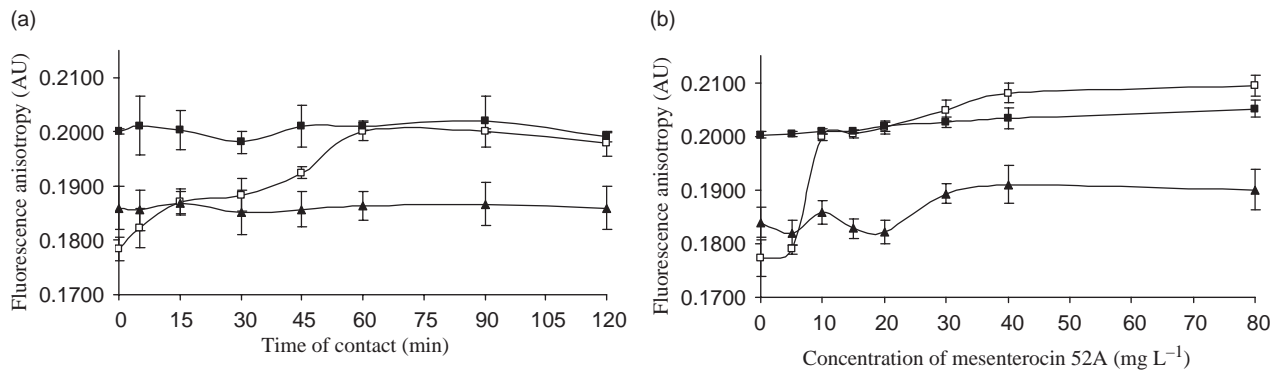


Fig. 1. Study of the fluorescence anisotropy of TMA-DPH at 30 °C (in arbitrary unit, AU), in (□): *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* LMA 7; (■): *L. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* LMA 7AR or in (▲): *Leuconostoc citreum* CIP 103405 to a final population of $2 \cdot 10^8$ CFU mL⁻¹; (a): as a function of time of contact (in min) with mesenterocin 52A ($1/2 \cdot \text{MIC} = 19 \text{ mg L}^{-1}$ for an $\text{OD}_{660 \text{ nm}} = 0.8$); (b): as a function of the concentration of mesenterocin 52A (in mg L⁻¹) after 60 min of incubation with the peptide. The factor of uncertainty is < 5%.

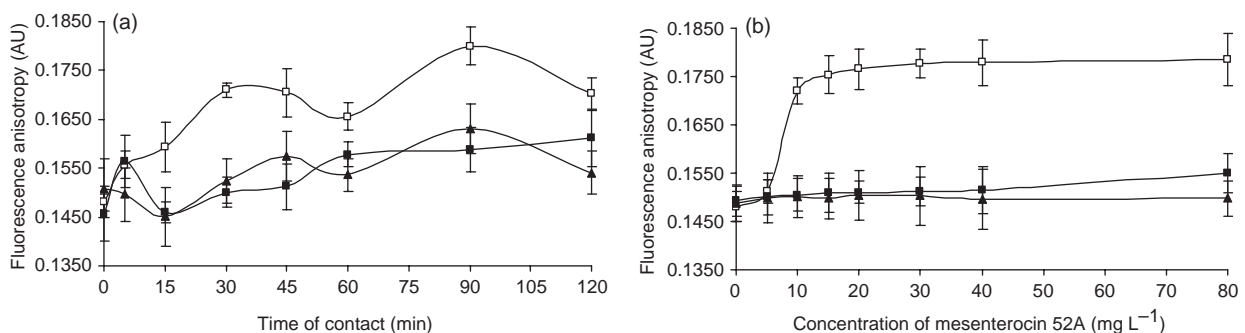


Fig. 2. Study of the fluorescence anisotropy of DPH at 30 °C (in arbitrary unit, AU), in (□): *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* LMA 7; (■): *L. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* LMA 7AR or in (▲): *Leuconostoc citreum* CIP 103405 to a final population of 2×10^8 CFU mL⁻¹; (a): as a function of time of contact (in min) with mesenterocin 52A ($1/2 \cdot \text{MIC} = 19 \text{ mg L}^{-1}$ for an $\text{OD}_{660 \text{ nm}} = 0.8$); (b): as a function of the concentration of mesenterocin 52A (in mg L⁻¹) after 60 min of incubation with the peptide. The factor of uncertainty is < 5%.

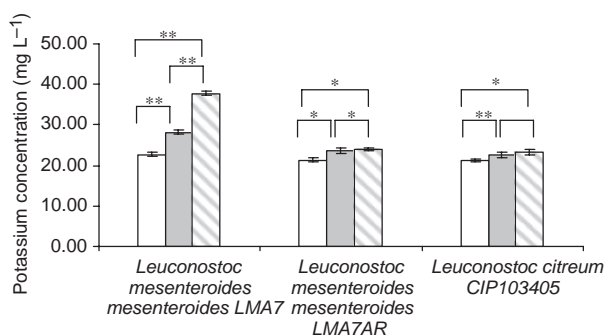


Fig. 3. Determination of the potassium concentration of the culture supernatant using atomic absorption spectrophotometry. □, without Mes 52A; ▒, with Mes 52A at $1/2 \cdot \text{MIC}$; ▨, with Mes 52A at the MIC. ANOVA: *, no significant difference; **, significant difference.

the addition of Mes 52A did not allow to observe any potassium efflux with the two resistant strains.

The impact of Mes 52A on ΔpH and $\Delta \Psi$ was determined (Table 1). Valinomycin and nigericin were used as positive

references. After the addition of the bacteriocin, the BCECF-AM fluorescence emission remained constant, indicating that Mes 52A did not perturb the ΔpH of sensitive or resistant strains. Mes 52A disrupted the $\Delta \Psi$ of the sensitive strain, observed by an increase of the fluorescence emission, whereas no change occurred in the two resistant strains.

Physico-chemical characterization of cell surfaces

The MATS test (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996) is a simple and rapid method to study the physico-chemical properties of microorganisms including their hydrophobicity and Lewis-acid/base or electron acceptor/electron donor character. For all the strains tested, the percentage of adhesion to the apolar solvent, hexane, decane and hexadecane, is almost 0, indicating that the surfaces are rather hydrophilic (Fig. 4). The two resistant strains used exhibited a significant percent

Table 1. Increase of fluorescence emission of DiSC₃(5) or of BCECF-AM expressed in percentage of the initial fluorescence normalized at 100%

Strains	Membrane potential ($\Delta\Psi$) with DiSC ₃ (5)			pH gradient (Δ pH) with BCECF-AM		
	Valinomycin	Mes 52A		Nigericin	Mes 52A	
		1/2*MIC	MIC		1/2*MIC	MIC
<i>L. mesenteroides</i> LMA 7	127 ± 6 (A)	104 ± 4 (B)	121 ± 3 (A)	75 ± 11 (A)	100 ± 1 (B)	100 ± 4 (B)
<i>L. mesenteroides</i> LMA 7AR	118 ± 4 (A)	100 ± 2 (B)	103 ± 3 (B)	77 ± 9 (A)	100 ± 1 (B)	100 ± 3 (B)
<i>L. citreum</i> CIP 103405	116 ± 5 (A)	100 ± 1 (B)	100 ± 2 (B)	64 ± 13 (A)	100 ± 2 (B)	100 ± 4 (B)

(A), significant; (B), not significant.

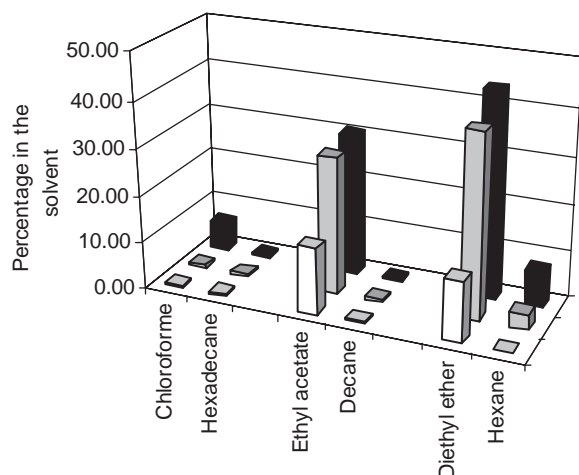


Fig. 4. Partition in organic solvents of the strains studied expressed in percentage of the initial OD_{660nm} in the solvent. □, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* LMA 7; ▒, *L. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* LMA 7AR; ■, *Leuconostoc citreum* CIP 103405. SD ≤ 3%.

of adhesion to ethyl acetate and diethyl ether, indicating a Lewis-acid character.

Discussion

In previous studies, we investigated the changes in the membrane composition and in the cell wall of *Leuconostoc* strains associated with insensitivity and resistance to Mes 52A and Mes 52B. The model was made with the two bacteriocins and eight target strains from the genera *Leuconostoc* and *Weissella* that were insensitive and had been made resistant to one mesenterocin (Limonet *et al.*, 2002, 2004). Resistance to bacteriocins seems to be a complex phenotype, involving membrane and/or protein modifications depending on the bacteriocin and the target strain studied (Sakayori *et al.*, 2003; Kramer *et al.*, 2006; Naghmouchi *et al.*, 2006). To obtain more informations on *Leuconostoc* resistance, the model was simplified and limited to the study of the interaction of one bacteriocin, Mes 52A, with a membrane of the only *Leuconostoc* strain insensitive to Mes 52A,

L. citreum CIP 103405, and of *L. mesenteroides* LMA 7 and its variant *L. mesenteroides* LMA 7AR, which is 4000-fold resistant to Mes 52A.

With the sensitive strain *L. mesenteroides* LMA 7 addition of the peptide induced a rapid increase of the fluorescence anisotropy of the two probes DPH and TMA-DPH, which proves that Mes 52A interacts both with the surface and with the deep of the phospholipidic bilayer. The presence of a potassium efflux was in accordance with the degree of penetration of Mes 52A. These results support the hypothesis that the bacteriocin could insert into the cytoplasmic membrane to form pores. Mes 52A does not disrupt the pH gradient, but has a significant impact on the membrane potential of this sensitive strain. Other described bacteriocins from the class IIa induce a potassium efflux or have an impact on $\Delta\Psi$ like enterocin P (Herranz *et al.*, 2001a, b) or piscicocin CS526 (Suzuki *et al.*, 2005).

For the resistant strain *L. mesenteroides* LMA 7AR or for the insensitive strain *L. citreum* CIP 130405, the presence of Mes 52A does not modify the proton motive force, nor potassium efflux. The resistance phenotype is not always associated with modification of such parameters. The K⁺ efflux from five variants of *L. monocytogenes* LSD 530 resistant to nisin A, nisin Z, pediocin PA-1 and divergicin M35 was significantly lower than from the parent strain, but still in effect (Naghmouchi *et al.*, 2007). In some nisin *L. monocytogenes* Scott A-resistant strains, the $\Delta\Psi$ was affected by nisin concentration up to the MIC value compared with the wild-type strain (Verheul *et al.*, 1997). The fluorescence anisotropy of TMA-DPH or DPH is not modified in the presence of bacteriocin. This indicates the absence of interaction between the membrane surface and the bacteriocin, and the absence of penetration in the deep of the membrane. We suppose that the absence of Mes 52A action could be due to modifications of the membrane surface or the membrane composition. In fact, the fatty acid and phospholipid composition of the three strains revealed significant differences as described in previous studies (Limonet *et al.*, 2002, 2004). The unsaturated and cyclic fatty acid contents of the three strains are significantly different. *Leuconostoc mesenteroides* LMA 7 has the highest

content of unsaturated fatty acid, compared with *L. mesenteroides* LMA 7AR and *L. citreum* CIP 130405, leading to a less rigid membrane. This is in accordance with the penetration of Mes 52A in the deep of the membrane. Moreover, it has been shown in previous studies (Limonet *et al.*, 2002) that the presence of Mes 52A induced a significant increase in saturated fatty acid contents in the resistant strain *L. mesenteroides* LMA 7AR and a decrease in unsaturated fatty acid content in the insensitive strain *L. citreum* CIP 130405. These modifications lead to a more rigid membrane. These two facts could explain the absence of penetration of Mes 52A into the heart of the membrane of these two strains. The membrane phospholipids of the wild-type strain are mostly anionic due to the presence of phosphatidylglycerol and diphosphatidylglycerol, while the membranes of the resistant and insensitive strains were *a priori* less negative due to an increase in the phosphatidylethanolamine content and a decrease in phosphatidylglycerol ones (Limonet *et al.*, 2004). It is established that the first step of the mechanism of action of bacteriocin involved electrostatic interactions between the cationic peptide and the negatively charged cell surfaces (Chen *et al.*, 1997). Such interactions are absent in the resistant and insensitive strains due to the less negative surface of the membrane and this has resulted in the absence of TMA-DPH anisotropy modifications. Similar results were obtained with Plantaricin A (Zhao *et al.*, 2006). The addition of negatively charged phospholipid increases the DPH emission anisotropy in the liposome, indicating the penetration of the peptide. The relation between Mes Y105 insertion and the charge of lipid mono- or bilayers had been demonstrated using polarization modulation infrared reflection absorption spectroscopy (Castano *et al.*, 2005). Results indicate that Mes Y105 selectively interacts with negatively charged lipids. However, a very limited insertion of the peptide, which remains localized at the interface, was observed by *in situ* infrared data. Such results were obtained with lipid vesicles, which are different from bacterial cells (Papo & Shai, 2003).

Physico-chemical differences were also indicated by the partition profiles in organic solvents (Fig. 4). The surface of all the strains studied is hydrophilic. Both resistant strains exhibit a high affinity for Lewis-basic solvents, indicating a Lewis-acid character of their envelope. These observations suggest that the envelope of the resistant strains is less anionic than the sensitive strain (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996). The cationic character of the cell surface could limit the crossing of the cationic bacteriocin through the envelope by electrostatic repulsion. In this case, the peptide could not reach the cytoplasmic membrane. The envelope could be a new support of resistance.

Our results were in accordance with the results obtained with mundticin KS on *E. faecium* or divergicin M35 on *L. monocytogenes* LSD 530, for which membrane

modifications are directly implicated in the resistance phenotype (Sakayori *et al.*, 2003; Naghmouchi *et al.*, 2007).

In our model with a class IIa bacteriocin, Mes 52A, and insensitive or resistant strains belonging to the *Leuconostoc* genus, there is a clear correlation between the physico-chemical characteristics of the membrane, the degree of Mes 52A penetration, the mechanism of action and resistance or the insensitivity characteristic of the target strain. In the presence of a fluid membrane and a negative surface, Mes 52A penetrates deep into the membrane, leading to a K⁺ efflux and modification of the $\Delta\Psi$, which induce a bacteriostatic effect. This is observed with the sensitive strain *L. mesenteroides* LMA7. In the presence of a less negative and rigid membrane, no penetration of Mes 52A occurred and no modification of $\Delta\Psi$ or ΔpH was observed. This was observed with an induced resistant strain, *L. mesenteroides* LMA7 AR, and one natural insensitive strain, *L. citreum* CIP 130405. However, the diversity of the results obtained in the literature to explain the resistance mechanism indicates that not just one universal mechanism exists.

Acknowledgements

We thank Michèle Turban and Delphine Roger for excellent technical assistance.

References

- Bellon-Fontaine MN, Rault J & van Oss CJ (1996) Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid–base properties of microbial cells. *Colloid Surface B* 7: 47–53.
- Bokas D, Uy D, Grattepanche F, Duportail G, Guedon E, Delaunay S & Goergen JL (2007) Cell envelope fluidity modification for an effective glutamate excretion in *Corynebacterium glutamicum* 2262. *76*: 773–781.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.
- Calvez S, Rince A, Auffray Y, Prevost H & Drider D (2007) Identification of new genes associated with intermediate resistance of *Enterococcus faecalis* to divercin V41, a pediocin-like bacteriocin. *Microbiology* 153: 1609–1618.
- Castano S, Desbat B, Delfour A, Dumas JM, da Silva A & Dufourcq J (2005) Study of structure and orientation of mesentericin Y105, a bacteriocin from Gram-positive *Leuconostoc mesenteroides*, and its Trp-substituted analogues in phospholipid environments. *Biochim Biophys Acta* 1668: 87–98.
- Chen Y, Ludescher RD & Montville TJ (1997) Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the

- binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. *Appl Environ Microb* **63**: 4770–4777.
- Crandall AD & Montville TJ (1998) Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. *Appl Environ Microb* **64**: 231–237.
- Dalet K, Briand C, Cenatiempo Y & Hechard Y (2000) The rpoN gene of *Enterococcus faecalis* directs sensitivity to subclass IIa bacteriocins. *Curr Microbiol* **41**: 441–443.
- Dalet K, Cenatiempo Y, Cossart P & Hechard Y (2001) A sigma(54)-dependent PTS permease of the mannose family is responsible for sensitivity of *Listeria monocytogenes* to mesentericin Y105. *Microbiology* **147**: 3263–3269.
- Duffes F, Jenoe P & Boyaval P (2000) Use of two-dimensional electrophoresis to study differential protein expression in divercin V41-resistant and wild-type strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microb* **66**: 4318–4324.
- Fleury Y, Dayem MA, Montagne JJ, Chaboisseau E, Le Caer JP, Nicolas P & Delfour A (1996) Covalent structure, synthesis, and structure-function studies of mesentericin Y 105(37), a defensive peptide from gram-positive bacteria *Leuconostoc mesenteroides*. *J Biol Chem* **271**: 14421–14429.
- Gravesen A, Ramnath M, Rechinger KB et al. (2002) High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology* **148**: 2361–2369.
- Hechard Y, Derijard B, Letellier F & Cenatiempo Y (1992) Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *J Gen Microbiol* **138**: 2725–2731.
- Hechard Y, Berjeaud JM & Cenatiempo Y (1999) Characterization of the mesB gene and expression of bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* Y105. *Curr Microbiol* **39**: 265–269.
- Hechard Y, Pelletier C, Cenatiempo Y & Frere J (2001) Analysis of sigma(54)-dependent genes in *Enterococcus faecalis*: a mannose PTS permease (EII(Man)) is involved in sensitivity to a bacteriocin, mesentericin Y105. *Microbiology* **147**: 1575–1580.
- Herranz C, Chen Y, Chung HJ, Cintas LM, Hernandez PE, Montville TJ & Chikindas ML (2001a) Enterocin P selectively dissipates the membrane potential of *Enterococcus faecium* T136. *Appl Environ Microb* **67**: 1689–1692.
- Herranz C, Cintas LM, Hernandez PE, Moll GN & Driessen AJ (2001b) Enterocin P causes potassium ion efflux from *Enterococcus faecium* T136 cells. *Antimicrob Agents Ch* **45**: 901–904.
- Klaenhammer TR (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **12**: 39–85.
- Kramer NE, van Hijum SA, Knol J, Kok J & Kuipers OP (2006) Transcriptome analysis reveals mechanisms by which *Lactococcus lactis* acquires nisin resistance. *Antimicrob Agents Ch* **50**: 1753–1761.
- Kuhry JG, Fonteneau P, Duportail G, Maechling C & Laustriat G (1983) TMA-DPH: a suitable fluorescence polarization probe for specific plasma membrane fluidity studies in intact living cells. *Cell Biophys* **5**: 129–140.
- Kuhry JG, Duportail G, Bronner C & Laustriat G (1985) Plasma membrane fluidity measurements on whole living cells by fluorescence anisotropy of trimethylammonium-diphenylhexatriene. *Biochim Biophys Acta* **845**: 60–67.
- Limonet M, Revol-Junelles AM & Milliere JB (2002) Variations in the membrane fatty acid composition of resistant or susceptible *Leuconostoc* or *Weissella* strains in the presence or absence of Mesenterocin 52A and Mesenterocin 52B produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52. *Appl Environ Microb* **68**: 2910–2916.
- Limonet M, Cailliez-Grimal C, Linder M, Revol-Junelles AM & Milliere JB (2004) Cell envelope analysis of insensitive, susceptible or resistant strains of *Leuconostoc* and *Weissella* genus to *Leuconostoc mesenteroides* FR 52 bacteriocins. *FEMS Microbiol Lett* **241**: 49–55.
- Maisnier-Patin S & Richard J (1996) Cell wall changes in nisin-resistant variants of *Listeria innocua* grown in the presence of high nisin concentrations. *FEMS Microbiol Lett* **140**: 29–35.
- Ming X & Daeschel MA (1993) Nisin resistance of foodborne bacteria and the specific resistance responses of *Listeria monocytogenes* ScottA. *J Food Protect* **56**: 944–948.
- Molenaar D, Abee T & Konings WN (1991) Continuous measurement of the cytoplasmic pH in *Lactococcus lactis* with a fluorescent pH indicator. *Biochim Biophys Acta* **1115**: 75–83.
- Naghmouchi K, Drider D, Kheadr E, Lacroix C, Prevost H & Fliss I (2006) Multiple characterizations of *Listeria monocytogenes* sensitive and insensitive variants to divergicin M35, a new pediocin-like bacteriocin. *J Appl Microbiol* **100**: 29–39.
- Naghmouchi K, Kheadr E, Lacroix C & Fliss I (2007) Class I/Class IIa bacteriocin cross-resistance phenomenon in *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol* **24**: 718–727.
- Papo N & Shai Y (2003) Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? *Peptides* **24**: 1693–1703.
- Revol-Junelles AM, Mathis R, Krier F, Fleury Y, Delfour A & Lefebvre G (1996) *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 synthesizes two distinct bacteriocins. *Lett Appl Microbiol* **23**: 120–124.
- Sakayori Y, Muramatsu M, Hanada S, Kamagata Y, Kawamoto S & Shima J (2003) Characterization of *Enterococcus faecium* mutants resistant to mundticin KS, a class IIa bacteriocin. *Microbiology* **149**: 2901–2908.
- Suzuki M, Yamamoto T, Kawai Y, Inoue N & Yamazaki K (2005) Mode of action of piscicocin CS526 produced by *Carnobacterium piscicola* CS526. *J Appl Microbiol* **98**: 1146–1151.
- Vadyvaloo V, Hastings JW, van der Merwe MJ & Rautenbach M (2002) Membranes of class IIa bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* cells contain increased levels of desaturated and

- short-acyl-chain phosphatidylglycerols. *Appl Environ Microb* **68**: 5223–5230.
- Verheul A, Russell NJ, Van THR, Rombouts FM & Abee T (1997) Modifications of membrane phospholipid composition in nisin-resistant *Listeria monocytogenes* Scott A. *Appl Environ Microb* **63**: 3451–3457.
- Zhao H, Sood R, Jutila A, Bose S, Fimland G, Nissen-Meyer J & Kinnunen PK (2006) Interaction of the antimicrobial peptide pheromone Plantaricin A with model membranes: implications for a novel mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* **1758**: 1461–1474.

II.3 Contribution de l'article

Le mode d'action de la méSENTÉROCINE 52A sur la souche sensible *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* LMA 7 est bactériostatique. La concentration minimale inhibitrice (CMI) est de 0,48 mg.L⁻¹ alors que la concentration minimale bactéricide (CMB) est de 500 mg.L⁻¹, trop élevée pour qualifier la bactériocine de bactéricide. Les deux souches résistantes présentent une CMI supérieure à 2000 mg.L⁻¹, confirmant ainsi leur phénotype de résistance.

La mesure de l'anisotropie de fluorescence des sondes TMA-DPH et DPH dans la membrane de la souche sensible, en présence de méSENTÉROCINE 52A, révèle une augmentation de la rigidité membranaire aussi bien en surface qu'en profondeur. L'adsorption et la pénétration du peptide dans la bicouche entraînent une compaction des têtes hydrophiles et des chaînes d'acides gras. Cette pénétration en profondeur est en corrélation directe avec la formation d'un pore. Ces résultats sont contradictoires avec ceux obtenus avec la méSENTÉROCINE Y105. Il a été montré que la bactériocine s'insère partiellement dans la bicouche augmentant ainsi le degré de compaction des têtes polaires sans toutefois modifier celui des chaînes d'acides gras (Castano *et al.*, 2005). Cependant, ces résultats ont été obtenus avec des vésicules lipidiques artificielles ne reflétant pas la complexité d'une cellule bactérienne dans son intégralité (Papo *et al.*, 2003).

Contrairement aux phénomènes observés en présence de la souche sensible, l'anisotropie de fluorescence des deux sondes dans la membrane des souches résistantes reste constante, même en présence de grande quantité de bactériocine. Ceci suggère que la bactériocine n'atteint pas la surface de la bicouche lipidique, et que le peptide ne s'adsorbe pas et ne pénètre pas dans la membrane.

Il est à noter que la valeur initiale (sans peptide) d'anisotropie de fluorescence du TMA-DPH pour les souches résistantes est plus élevée que celle obtenue avec la souche sensible. Le variant résistant *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* LMA 7AR présente la surface la plus rigide. Cependant, la valeur initiale d'anisotropie de fluorescence du DPH est similaire pour les trois souches indiquant une fluidité au cœur de la membrane identique.

Ces résultats sont en corrélation directe avec la composition membranaire en acides gras et en phospholipides qui est significativement différente entre les trois souches (Limonet *et al.*, 2002 ; Limonet *et al.*, 2004a).

Leuconostoc mesenteroides subsp *mesentroides* LMA 7 est la souche présentant la plus grande proportion d'acides gras insaturés comparativement aux deux autres souches résistantes. Ceci suggère que la membrane de la souche sensible est plus fluide, ce qui pourrait expliquer la pénétration en profondeur de la mésentéroïcine 52A. De plus, il a été montré que la présence de la mésentéroïcine 52A induit une augmentation significative de la proportion en acides gras saturés chez le variant résistant et une diminution de la quantité en acides gras insaturés chez la souche naturellement insensible. Ces deux types de modifications entraînent le même type de conséquence, c'est-à-dire une augmentation de la rigidité de la membrane. Les variations de la composition en acides gras pourraient donc expliquer l'absence de pénétration en profondeur de la bactériocine chez ces deux souches résistantes.

La membrane de la souche sensible est plus anionique du fait de la présence de phosphatidylglycérol et de diphosphatidylglycérol que celle des deux souches résistantes, qui présentent plus de phosphatidyléthanolamine et moins de phosphatidylglycérol (Limonet *et al.*, 2004a). Cette membrane plus anionique favoriserait la première étape du mécanisme d'action qui est l'adsorption de la bactériocine sur la membrane cytoplasmique. Un phénomène contraire se passerait chez les deux souches résistantes ; leur membrane moins anionique défavoriserait l'établissement de liaisons électrostatiques avec le peptide cationique, ce qui pourrait expliquer l'absence de variation de l'anisotropie de fluorescence du TMA-DPH.

La mesure de l'affinité des souches pour les solvants organiques a permis de montrer une différence de profil entre la souche sensible et les deux souches résistantes. Ces dernières ont une meilleure adhésion aux solvants basiques selon Lewis traduisant un caractère acide de leur enveloppe. Par conséquent, ce caractère cationique empêcherait probablement l'arrivée de la bactériocine jusqu'à la membrane grâce à des répulsions électrostatiques. L'enveloppe plus cationique pourrait ainsi être un support de la résistance aux peptides antibactériens.

Les conséquences physiologiques de l'insertion du peptide dans la membrane ont été étudiées. La mésentéroïcine 52A s'insère en profondeur dans la membrane de la souche

sensible pour y former un pore. Cette formation de pore se traduit par des efflux de composés vitaux vers le milieu extérieur. Des fuites de potassium ont été mesurées uniquement chez la souche *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* LMA 7 aboutissant à une dissipation du potentiel de membrane sans toutefois affecter le gradient de pH.

Cette publication a permis de montrer une relation claire entre les caractères physico-chimiques de la membrane, le degré de pénétration de la mésentéroïne 52A, le mécanisme d'action et la sensibilité de la souche cible. Ces résultats ne peuvent cependant pas être généralisés à l'ensemble des bactériocines. La diversité des résultats publiés indique que le mécanisme de résistance aux bactériocines n'est pas dû à un changement unique d'un caractère phénotypique mais à un ensemble de changements et semble spécifique à un couple bactériocine/cellule.

III. Optimisation des procédés de production et de purification des carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2 de *Carnobacterium maltaromaticum* CP5 produites par expression hétérologue chez *Escherichia coli*

III.1 Introduction

L'étude du spectre d'activité, des synergies d'action, ainsi que du mécanisme d'action des deux carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2, produites par la souche *C. maltaromaticum* CP5 isolée au laboratoire, nécessite des quantités importantes en peptides ainsi qu'un haut degré de pureté.

Pour obtenir des bactériocines purifiées, trois stratégies sont envisageables. La première consiste en la purification des carnobactériocines à partir du surnageant de culture de la souche naturellement productrice (Yang *et al.*, 1992 ; Jack *et al.*, 1996 ; Guyonnet *et al.*, 2000). Les inconvénients de ce protocole sont multiples. En effet, les produits d'intérêt sont présents dans le milieu de culture en faible quantité. De plus, ces faibles proportions de bactériocines sont dans un mélange complexe de peptides concentrés, rendant la purification délicate. Enfin, *C. maltaromaticum* CP5 produit simultanément deux carnobactériocines et les caractéristiques physico-chimiques de ces deux peptides sont très proches rendant la séparation de ces entités difficile. La deuxième option est la synthèse chimique. Le principal obstacle est le prix. Les carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2 sont de grands peptides, respectivement 43 et 48 résidus d'acides aminés, la synthèse est donc difficile. Les devis estiment à 2300 € les 10 mg de chaque peptide ayant une pureté de 95 %. La dernière option envisageable est la production hétérologue (Gibbs *et al.*, 2004 ; Richard *et al.*, 2004a). C'est cette dernière alternative qui a été retenue. Contrairement aux précédentes études publiées qui se sont focalisées sur les constructions génétiques et les étapes de purification, l'optimisation de la production *via* la fermentation a été réalisée.

III.2 "Optimization of the production and purification processes of carnobacteriocins Cbn BM1 and Cbn B2 from *Carnobacterium maltaromaticum* CP5 by heterologous expression in *Escherichia coli*"

Optimization of the production and purification processes of carnobacteriocins Cbn BM1 and Cbn B2 from *Carnobacterium maltaromaticum* CP5 by heterologous expression in *Escherichia coli*

Jordane Jasniewski ^a, Catherine Cailliez-Grimal ^{a,*}, Eric Gelhaye ^b, Anne-Marie Revol-Junelles ^a

^a Laboratoire de Science et Génie Alimentaires (LSGA), Nancy-Université, 2 avenue de la Forêt de Haye, B.P. 172 F-54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

^b Unité Mixte de Recherches 1136 INRA UHP (Interaction Arbres Microorganismes), IFR 110 Génomique Ecophysiologie et Ecologie Fonctionnelles, Nancy-Université, BP 239, 54506, Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

Received 10 October 2007; received in revised form 8 January 2008; accepted 18 January 2008

Available online 6 February 2008

Abstract

An optimization of the production and purification processes of carnobacteriocins Cbn BM1 and Cbn B2 from *Carnobacterium maltaromaticum* CP5, by heterologous expression in *Escherichia coli* is described. The genes encoding mature bacteriocin were cloned into an *E. coli* expression system and expressed as a fusion protein with a thermostable thioredoxin. Recombinant *E. coli* were cultivated following a fed-batch fermentation process with pH, temperature and oxygenation regulation. The overexpression of the fusion proteins was improved by replacing IPTG by lactose. The fusion proteins were purified by thermal coagulation followed by affinity chromatography. The thioredoxin fusion protein was removed by using CNBr instead of enterokinase and the carnobacteriocins were recovered by reverse-phase chromatography. These optimizations led us to produce up to 320 mg of pure protein per liter of culture, which is four to ten fold higher than what is described for other heterologous expression systems.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Carnobacteriocin; Antibacterial peptide; Heterologous expression system; Recombinant protein production

1. Introduction

Bacteriocins are ribosomal antimicrobial peptides synthesized by Gram-positive lactic acid bacteria (LAB) exhibiting an antibacterial activity, generally against closed phylogenetically bacteria (Tagg et al., 1976). Consequently, they are potential therapeutic and food preservative agents. Bacteriocins are classified into four classes (Klaenhammer, 1993; Nes et al., 1996). The class IIa peptides have an antilisterial activity and contain the following N-terminal consensus sequence: YYGNGVxCxxxxCxVxWGxAxxxI (Fimland et al., 2002). Among the class IIa bacteriocins synthesized by LAB strains,

Carnobacterium is an important producer secreting several carnobacteriocins (Leisner et al., 2007).

Carnobacterium piscicola CP5 was first isolated from a French mold ripened cheese and later identified as *C. maltaromaticum* CP5 according to new taxonomic changes (Mora et al., 2003). *C. maltaromaticum* CP5 produces two carnobacteriocins, CP51 and CP52 (Herbin et al., 1997) respectively similar to carnobacteriocins BM1 (Cbn BM1) and B2 (Cbn B2) produced by *C. piscicola* LV17, isolated from vacuum-packed meat (Ahn et al., 1990) and its derivative *C. piscicola* LV17B (Quadri et al., 1994). These bacteriocins, Cbn B2 (48 AA) and Cbn BM1 (43 AA), are active against Gram-positive bacteria, including *Carnobacterium*, *Enterococcus* and *Listeria* spp. strains (Mathieu et al., 1993; Quadri et al., 1994) and contain one disulfide bridge in their active form (Quadri et al., 1994; Herbin et al., 1997). The three-dimensional structure of Cbn B2 was determined by NMR (Sprules et al., 2004). In trifluoroethanol, Cbn B2 has a well-

* Corresponding author. Tel.: +33 0 3 83 59 58 84; fax: +33 0 3 83 59 57 71.

E-mail address: Catherine.Cailliez@ensaia.inpl-nancy.fr (C. Cailliez-Grimal).

defined central helical structure (residues 18–39) and a disordered N-terminus (Wang et al., 1999). The genetic requirements for bacteriocin production and immunity as well as the regular mechanism involved in bacteriocin production have been well characterized (Quadri et al., 1997; Kleerebezem et al., 2001).

A large-scale production and purification of bacteriocin is a prerequisite step both for industrial applications (in pharmaceuticals or food industry) and for further characterization of the peptide. Bacteriocins can be purified simply from the native producer strain (Jack et al., 1996; Guyonnet et al., 2000), however the expressed amount remains very low. In food industries, heterologous expression of pediocin PA-1 in *Lactococcus lactis* (Horn et al., 1999) or of acidocin A in *Lactobacillus casei* (Kanatani et al., 1995) allows to produce these bacteriocins during the lactic fermentation process. These strategies do not allow producing high quantity of bacteriocin for a purification strategy; however the yields were sufficient to prevent bacterial contamination, thus preserving the organoleptic properties of the product.

Standard purification strategies using usual chromatographic methods can be used after bacteriocin production by the natural producer cell. These methods have been extensively used in the past to purify many bacteriocins, but peptide recovery is generally low, of about $100 \mu\text{g L}^{-1}$ of culture supernatant. Recently, Piscicocin CS526 from *C. piscicola* CS526 (Yamazaki et al., 2005) and Divergicin M35 from *C. divergens* M35 (Tahiri et al., 2004) have been purified using such strategies. Other methods have been developed like adsorption/desorption of the bacteriocin from the producer cell membrane. These electrostatic interactions can be enhanced by pH variations (Yang et al., 1992). With such small quantities of purified peptide the characterization of structural properties or mechanism of action of peptide is limited. The triton X-114 phase partitioning has permitted to isolate pediocin-like bacteriocin from *Carnobacterium divergens* V41. This method allows to obtain low purified quantity, about 10 mg per liter of culture supernatant (Metivier et al., 2000). Another strategy consists of producing bacteriocins by heterologous expression in *Escherichia coli*. This facultative anaerobic strain has no nutritional exigency and grows easily than natural producer strains. The production of bacteriocins as divercin and piscicolin using this approach leads to a higher bacteriocin production allowing to obtain around 20 mg L^{-1} of purified protein (Richard et al., 2004; Gibbs et al., 2004). In these reported examples, the bacteriocins were produced as a fusion protein with a thioredoxin associated with a His-tag allowing purification in three steps. Two distinct cleavages were tested. On the bacteriocin which present methionine residue in the primary structure like the carnobacteriocin BM1, an enzymatic cleavage with enterokinase was performed, the site D-D-D-D-K recognized by the enzyme being added just upstream of the mature carnobacteriocin sequence in the fusion protein. When any methionine residue was present in the bacteriocin primary structure like in the carnobacteriocin B2, a chemical cleavage was performed with CNBr, since this chemical agent cut the peptides by degradation of methionine residues. The addition of a methionine residue just upstream of the carnobacteriocin B2 sequence inside the fusion protein Trx-

B2 was indispensable to perform a chemical cleavage with CNBr to recover the mature peptide (Ausubel, 1991).

After a chemical or an enzymatic cleavage, the peptides were purified by an ion metal affinity chromatography (IMAC) or a reversed-phase HPLC. In a quite similar approach, carnobacteriocin B2 was combined with the maltose-binding protein (*malE*) and had been produced by heterologous expression in *E. coli* (Quadri et al., 1997). The cleavage was realised with the Factor Xa leading to a production yield comprised between 20 to 50 mg per liter.

In all the attempts of heterologous production of bacteriocin in *E. coli*, previous studies focused only on the plasmid construction to facilitate the purification process by IMAC. The objective of this present study was to optimize the protein overexpression by Fed-Batch process and the purification methods in order to obtain high quantities of Cbn BM1 and Cbn B2.

2. Materials and methods

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

Carnobacterium maltaromaticum CP5 strain (private collection, Nancy-Université Laboratoire de Microbiologie Alimentaire, Nancy, France) was cultivated in APT Broth (Difco, Livonia, Michigan, USA) at 30°C for 24 h.

E. coli strains DH5 α (Invitrogen, Paisley, UK) and BL21 (DE3) (Novagen, Madison, Wisconsin, USA) were cultivated in Nutrient Broth (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) or in modified Terrific Broth (Bacto-peptone [Difco] 12 g L^{-1} ; Bacto-tryptone 6 g L^{-1} [Becton Dickinson and Company, Sparks, Maryland, USA], Bacto-yeast extract [Becton Dickinson and Company] 24 g L^{-1} ; glycerol 99.5% [Normapur VWR international, Fontenay sous bois, France] 5 mL; KH_2PO_4 2.31 g L^{-1} [VWR international] and K_2HPO_4 12.54 g L^{-1} [Labosi Fisher Scientific, Elancourt, France]) at 37°C for 24 h. *Listeria ivanovii* CIP12510 strain from Collection de l'Institut Pasteur (CIP, Paris, France) was cultivated 24 h at 30°C in Trypticase soy broth (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) supplemented with Bacto-yeast extract to 6 g L^{-1} .

Agar medium was prepared by addition of bacteriological agar (Biokar, Beauvais, France) to a final concentration of 16 g L^{-1} . When required, carbenicillin (Euromedex Souffelweyersheim, France) was added at a final concentration of 100 mg L^{-1} . All strains were stored in appropriate culture medium supplemented with glycerol (10%) at -30°C and propagated twice before use. The genes encoding mature carnobacteriocins BM1 and B2 were amplified from chromosome and pCP40 plasmid DNA, respectively (Quadri et al., 1994) of *C. maltaromaticum* CP5 after standard extraction and purification steps (Sambrook and Russell, 2001). The carnobacteriocin BM1 $_{M41} \rightarrow V$ was a mutant generated from the carnobacteriocin BM1. The methionine residue at the position 41 was replaced by a valine residue by PCR with the oligonucleotide BM1 $_{M41} \rightarrow V$ down (Table 1), this mutation allowing the chemical cleavage with CNBr.

Oligonucleotides used in PCR step were described in Table 1 (Quadri et al., 1994). DNA sequences of the primers were

Table 1
 Sequences, restrictions and cleavage site of the oligonucleotides used in PCR

Oligonucleotide	Sequence
Cbn B2 up	5'- <u>TTCCATGGGTATGGTAAATTATGGTAATGGTGTTCCTTGCAG</u> -3' NcoI Met
Cbn B2 down	5'- <u>TGAATTCTTACGGTCTCCTACCAATGGATCCTG</u> -3' EcoRI
Cbn BM1 wt up	5'- <u>TTGGTACCGACGACGACGACAAGGCTATCTCTTATGGCAATGGTGTTCCTTATG</u> -3' KpnI Enterokinase
Cbn BM1 wt down	5'- <u>TGAATTCTTAATGTCCCATTCTCTGCTAAACTAGAAG</u> -3' EcoRI
Cbn BM1 M ₄₁ →V up	5'- <u>AACCATGGGTATGGCTATCTCTTATGGCAATGGTGTTCCTTATG</u> -3' NcoI Met
Cbn BM1 M ₄₁ →V down	5'- <u>TGAATTCTTAATGTCCCCTCTGCTAAACTAGAAG</u> -3' EcoRI Met→Val

obtained from Eurogentec (Liège, Belgium). PCR amplification was performed on a iCycler (BioRad, Marnes-la-Coquette, France). The program was initial denaturation at 95 °C for 5 min and thirty cycles with denaturing at 95 °C for 1 min, annealing at 55 °C for 30 s and polymerisation at 75 °C for 30 s and performed with DeepVent Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA) used with the conditions recommended by the supplier. Genes encoding mature bacteriocins were cloned with standard protocol (Sambrook and Russell, 2001) using double digestion with restriction enzymes (*NcoI*/*EcoRI* or *KpnI*/*EcoRI* from New England Biolabs used in recommended conditions) and ligation (T4 ligase, New England Biolabs) into the *E. coli* expression plasmid pET32a (Novagen). After electroporation (Gene Pulser Cell, CE module, PC module and Shock Pod, BioRad) in *E. coli* DH5 α , all plasmids (Table 2) were produced and sequenced (GATC Biotech, Konstanz, Germany). The *E. coli* BL21 (DE3) was transformed with these different plasmids to allow the production of the fusion protein.

2.2. Comparaison between IPTG and lactose induction

Recombinant *E. coli* BL21 (DE3) were cultured in 100 mL of modified Terrific Broth (Sambrook and Russell, 2001) supplemented with carbenicillin (100 mg L⁻¹) at 37 °C. When the optical density at 660 nm (O.D₆₆₀) reached 1, the cultures were stopped by a quick cooling (the flasks were plunged in cold (-20 °C) ethanol). These cultures were used to inoculate a new flask (100 mL) containing the same medium or a 2 L reactor (see below). The initial O.D₆₆₀ in the flask was 0.1.

When the optical density at 660 nm reached a value of 1, the production was induced by the addition of either IPTG at a final concentration of 0.55 mM or lactose at a final concentration of 14.6 mM. After 3 h of production at 37 °C under shaking (250 rpm), a sample corresponding to 0.2 unit of optical density at 660 nm was analyzed by 12% tricine sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

2.3. Fed-Batch culture of recombinant carnobacteriocins BM1, B2 and BM1M₄₁→V

Previous pre-cultures were used to inoculate a 2 L reactor (Applikon, Schiedam, Holland) containing 1 L of modified Terrific Broth supplemented with carbenicillin (250 mg L⁻¹). The initial O.D₆₆₀ in the reactor was 0.1. Temperature was set to 37±0.1 °C and pH was kept at 7.0±0.1 (BioController ADI 1030, Applikon). Air-flow was adjusted to 120 L h⁻¹ (pO₂>20%) and the stirrer speed was set 900 rpm (two Rushton mobiles and four baffles) until the O.D₆₆₀ of the culture reached 1. Protein expression was induced by continuous addition of a solution of lactose (66.7 g L⁻¹; flow rate of 15 mL h⁻¹) containing

 Table 2
 Plasmids used in this work

Plasmid	Relevant properties	Source
pET32a	Ampr, T7 promoter, T7 transcription start, Thioredoxin tag, His tag, lacI, pBR322 origin.	Novagen
pET32a-B2	Carnobacteriocin B2 gene was cloned into pET32a to produce a thioredoxin fusion protein called Trx-B2. This fusion protein contained a His tag for affinity purification and a Met residue immediately preceding carnobacteriocin B2 for cleavage of the fusion protein with CNBr	This study
pET32a-BM1	Carnobacteriocin BM1 gene was cloned into pET32a to produce a thioredoxin fusion protein called Trx-BM1. This fusion protein contained a His tag for affinity purification and an enterokinase site immediately preceding carnobacteriocin BM1 for cleavage of the fusion protein.	This study
pET32a-BM1 M ₄₁ →V	Carnobacteriocin BM1 M ₄₁ →V (Met41 residue was replaced by a Val residue) gene was cloned into pET32a to produce a thioredoxin fusion protein called Trx-BM1 M ₄₁ →V. This fusion protein contained a His tag for affinity purification and a Met residue immediately preceding carnobacteriocin BM1 for cleavage of the fusion protein with CNBr.	This study

```

                RBS                Thioredoxin A tag
TAGNAGAAATCCCTCTGAATATTTGTTTACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAGCGATAAAATTTATTCACCTGACTGACGACAGTTTTGACACGGAT
                M S D K I I H L T D D S F D T D
.
GTA CTCAAAGCGGACGGGGCGATCCTCGTCGATTTCTGGGCAGAGTGGTGCGGTCCGTGCAAAATGATCGCCCCGATTTCTGGATGAAATCGCTGACGAAT
V L K A D G A I L V D F W A E W C G P C K M I A P I L D E I A D E
.
ATCAGGGCAAACCTGACCGTTGCAAACTGAACATCGATCAAAACCCCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGTGGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAA
Y Q G K L T V A K L N I D Q N P G T A P K Y G I R G I P T L L L F K
.
AAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAGTGGGTGCACTGTCTAAAGGTCAGTTGAAAGAGTTCCCTCGACGCTAACCTGGCCGGTTCTGGTCTGGCCATATG
N G E V A A T K V G A L S K G Q L K E F L D A N L A G S G S G H M
His tag
CACCATCATCATCATCTTCTGGTCTGGTGCCACGCGGTTCTGGTATGAAAGAAACCGCTGCTGCTAAATTCGAACGCCAGCACATGGACAGCCCGAC
H H H H H S S G L V P R G S G M K E T A A A K F E R Q H M D S P
                Kpn I enterokinase                Carnobacteriocin BM1
ATCTGGGTACCGACGACGACGACAAGGCTATCTCTTATGGCAATGGTGTATTATGTAACAAGAGAAATGTTGGGTAAACAAGGCAGAAAACAAACAAGC
D L G T D D D D K A I S Y G N G V Y C N K E K C W V N K A E N K Q A
                Eco RI
TATTACTGGAATAGTTATCGGTGGATGGGCTTCTAGTTTAGCAGGAATGGGACATTAAGAATTCGAGCTCCGTGCAACAAGCTTGGCGCCGCACTCGAGCA
I T G I V I G G W A S S L A G M G H * E F E L R R Q A C G R T R A
    
```

Fig. 1. pET32a-BM1 sequence and translation. The synthesized fusion protein thioredoxin-carnobacteriocin BM1 is shown with the locations of the thioredoxin A tag, His tag, enterokinase cleavage site, mature carnobacteriocin BM1 peptide and restriction sites.

carbenicillin (250 mg L⁻¹) (Merck, Darmstadt, Germany). After 24 h of production, cells were harvested by centrifugation (10,000 rpm for 20 min at 4 °C, (J2-HS Centrifuge, Beckman, Villepinte, France) and washed twice with physiological water at 4 °C. Cell pellets were stored at -30 °C.

2.4. Purification of recombinant bacteriocins

Cell pellets were suspended in PBS buffer (KCl 0.2 g L⁻¹ [Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri USA]; KH₂PO₄ 0.2 g L⁻¹; NaCl 8 g L⁻¹ [Fisher Scientific] and Na₂HPO₄, 2H₂O 1.44 g L⁻¹ [Merck]) and lysed twice with a Constant Disruptor Cell System (CellD, Roquemaure, France) at 1350 bar. Cell debris was removed by centrifugation (20,000 rpm, 30 min at 4 °C) (Centrifuge 5804R, Eppendorf, Le Pecq, France).

Contaminant of high molecular weight were eliminated by centrifugation (13,000 rpm, 15 min at 4 °C) after a thermal coagulation (85 °C, 20 min) (Polystat, Bioblock Fisher Scientific).

The cleared supernatant was loaded on an IMAC (ProBond Resin, Invitrogen) used according to manufacturer's instructions. The obtained fractions were checked by 12% tricine sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Sambrook and Russell, 2001). The SDS-PAGE was carried out with a Mini Protean II system (BioRad), BenchMark™ protein ladder and Mark 12™ (Invitrogen) as molecular weight standard. Quantification was measured by using Versadoc (Biorad).

2.5. Protein cleavage by enterokinase

The IMAC fractions with the Trx-BM1 were desalted with PD10 column (Amersham Biosciences, GE healthcare, Orsay, France) and were eluted with the buffer of the enterokinase (Tris 50 mM, pH 7 [Euromedex]). The protein concentration of the fractions was determined by using the Bradford method with bovin serum albumin (Sigma-Aldrich) as the protein standard. The fusion protein was cleaved with enterokinase (Sigma-Aldrich) as

```

                RBS                Thioredoxin A tag
AGAAATCCCTCTAGAAATTTGTTTACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAGCGATAAAATTTATTCACCTGACTGACGACAGTTTTGACACGGATGA
                M S D K I I H L T D D S F D T D V
.
CTCAAAGCGGACGGGGCGATCCTCGTCGATTTCTGGGCAGAGTGGTGCGGTCCGTGCAAAATGATCGCCCCGATTTCTGGATGAAATCGCTGACGAATATC
L K A D G A I L V D F W A E W C G P C K M I A P I L D E I A D E Y
.
AGGGCAAACCTGACCGTTGCAAACTGAACATCGATCAAAACCCCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGTGGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAA
Q G K L T V A K L N I D Q N P G T A P K Y G I R G I P T L L L F K N
.
CGGTGAAGTGGCGGCAACCAAGTGGGTGCACTGTCTAAAGGTCAGTTGAAAGAGTTCCCTCGACGCTAACCTGGCCGGTTCTGGTCTGGCCATATGCA
G E V A A T K V G A L S K G Q L K E F L D A N L A G S G S G H M H
His tag
CATCATCATCATCATCTTCTGGTCTGGTGCCACGCGGTTCTGGTATGAAAGAAACCGCTGCTGCTAAATTCGAACGCCAGCACATGGACAGCCCGATC
H H H H H S S G L V P R G S G M K E T A A A K F E R Q H M D S P D
                Nco I                Carnobacteriocin B2
TGGGTACCGACGACGACGACAAGGCCATGGGTAAATATGGTAATGGTGTCTTCTGTCAGTAAACAAGAAATGTTTCAGTTAACTGGGGACAAGCCCTT
L G T D D D D K A M G M V N Y G N G V S C S K T K C S V N W G Q A F
                Eco RI
TCAAGAAAGATACACAGCTGGAATTAACCTATTTGTAAGTGGAGTCGCTTCTGGGGCAGGATCCATTTGGTAGGAGACCGTAAGAATTCGAGCTCCGTGCA
Q E R Y T A G I N S F V S G V A S G A G S I G R R P * E F E L R R
    
```

Fig. 2. pET32a-B2 sequence and translation. The synthesized fusion protein thioredoxin-carnobacteriocin B2 is shown with the locations of the thioredoxin A tag, mature carnobacteriocin B2 peptide and restriction sites. All Met residues in bold to indicate the CNBr cleavage sites are shown.

```

                RBS                Thioredoxin A tag
taTTTTGTTnncttTAAGAAGGAGATATACATATGAGCGATAaaaTTATTACCTGACTGACGACAGTTTTGACACGGATGTACTCAAAGCGGACGGGG
                M S D K I I H L T D D S F D T D V L K A D G

CGATCCTCGTCGATTTCTGGGCAGAGTGGTGCGGTCCGTGCAAATGATCGCCCCGATTTCTGGATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACGACCGT
A I L V D F W A E W C G P C K M I A P I L D E I A D E Y Q G K L T V

TGCAAACCTGAACATCGATCAAACCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGTGGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAACGGTGAAGTGGCGGCA
A K L N I D Q N P G T A P K Y G I R G I P T L L L F K N G E V A A

ACCAAAGTGGGTGCACTGTCTAAAGGTCAGTTGAAAGAGTTCTCGACGCTAACCTGGCCGTTCTGGTTCTGGCCATATGCACCATCATCATCATT
T K V G A L S K G Q L K E F L D A N L A G S G S G H M H H H H H H

CTTCTGGTCTGGTGCCACGCGTTCTGGTATGAAAGAAACCGCTGCTGCTAAATTCGAACGCCAGCACATGGACAGCCAGATCTGGGTACCGACGACGA
S S G L V P R G S G M K E T A A A K F E R Q H M D S P D L G T D D D

                Nco I                Carnobacteriocin BM1 M41→V
CGACAAGGCCATGGGTATGGCTATCTCTTATGGCAATGGTGTATTGTAACAAAGAGAAATGTTGGGTAAACAAGGCAGAAAACAAACAAGTATTACT
D K A M G M A I S Y G N G V Y C N K E K C W V N K A E N K Q A I T

                Eco RI
GGAATAGTTATCGGTGGATGGGCTTCTAGTTTAGCAGGAGTGGGACATTAAGAATTCGAG
G I V I G G W A S S L A G V G H * E F E
    
```

Fig. 3. pET32a-BM1 M₄₁→V sequence and translation. The synthesized fusion protein thioredoxin-carnobacteriocin BM1 M₄₁→V is shown with the locations of the thioredoxin A tag, mature carnobacteriocin BM1 M₄₁→V peptide and restriction sites. All Met residues in bold to indicate the CNBr cleavage sites are shown.

recommended by the supplier. The cleavage efficiency was verified by SDS-PAGE. The mature carnobacteriocin was purified by HPLC (see below).

2.6. Protein cleavage by CNBr

The fractions of IMAC containing the fusion Trx-B2 (or Trx-M₄₁→V) were lyophilised. Cyanogen bromide cleavage was performed in 80% formic acid (Labogros Grosseron, Saint-Herblain, France) mixing 5 mg mL⁻¹ of freeze dried recombinant carnobacteriocin (Cbn B2 or Cbn BM1M₄₁→V) and 100 mg mL⁻¹ of CNBr (Sigma-Aldrich). This solution was incubated 18 h in the dark at room temperature (Ausubel, 1991).

2.7. Reverse-phase liquid chromatography

The solution was applied to LichroCART 250-4 Purospher RP-18 column (Merck) washed with buffer A (water; 0.1% trifluoroacetic acid (Sigma-Aldrich) (v/v)). Bound protein was eluted with buffer B (acetonitrile 100% (Fisher Scientific); 0.1% trifluoroacetic acid (v/v)) at 0.7 mL min⁻¹ flow and with the following gradient: 0 to 10 min, 0% buffer B; 10 to 30 min, 30% buffer B; 30 to 40 min, increase to 100% buffer B; 40 to 65 min, 100% buffer B and 65 to 80; 0% buffer B. Fractions were collected at thirty seconds intervals and analyzed for antimicrobial activity.

2.8. Measurement of bacteriocin activity

Antilisterial activity was determined by the agar well diffusion method described by Mathieu et al. (1993). *Listeria ivanovii* CIP12510 was inoculated in a Trypticase soy agar (1.2% bacteriological agar, Biokar) medium supplemented with 1% Tween 80 (Merck, Germany) and poured in Petri dishes. A 25 µL of the fraction tested was placed into a 5-mm agar well. Agar plates were allowed to diffuse overnight at 4 °C and then incubated at 30 °C for at least 10 h. Titre of bacteriocin, in Arbitrary Units per milligram (AU mg⁻¹) determined by the

critical dilution method, was expressed as the reciprocal of the highest dilution showing a definite zone of inhibition. Assays were performed in triplicate.

3. Results and discussion

3.1. Synthesis of recombinant Trx-carnobacteriocins

The genes encoding the carnobacteriocins BM1 and B2 were amplified by PCR. The amplified fragments were cloned into the expression vector pET32a creating a translational fusion with thioredoxin (Table 1). The PCR products cloned into the plasmid pET32a generated the vectors pET32a-BM1, pET32a-B2 or pET32a-BM1M₄₁→V. They were used to transform *E. coli* BL21 (DE3). The integrity of the site for the enzymes of restriction was verified by double digestion reaction with the recombinant plasmid. The cloning region of each recombinant plasmid was verified by sequencing (Figs. 1, 2 and 3).

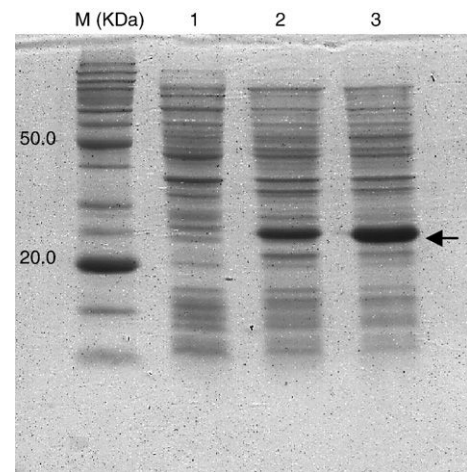


Fig. 4. Comparison of the production of the fusion protein Thioredoxin-Cbn BM1 by induction with lactose or with IPTG. Lane M, Size marker BenchMarker (Invitrogen); lane 1, no induction; lane 2, IPTG induction; lane 3, lactose induction.

Table 3
 Purification of Trx-carnobacteriocins

	B2	BM1	BM1 M ₄₁ →V
Protein crude extract (g L ⁻¹)	9.28	9.19	9.38
After thermal coagulation (g L ⁻¹)	2.59	2.65	2.62
After IMAC (g L ⁻¹)	1.58	1.60	1.67
After cleavage and HPLC (mg L ⁻¹)	321 ^a	150 ^b	320 ^a
Cleavage efficiency (%)	91	44	93

^a Cleavage with CNBr.

^b Cleavage with enterokinase.

3.2. Optimization of the culture conditions of recombinant *E. coli*: Fed-Batch fermentation process and protein overexpression

The bacteriocin production efficiency after induction (three hours) by either IPTG or lactose has been compared using 100 mL cultures. The production was significantly better, a 1.5 to 2-fold increase with the lactose than the IPTG (Fig. 4) because contrary to the IPTG, the lactose was not toxic so it did not stop the bacterial growth (Yildirim et al., 2007).

Currently, heterologous production of bacteriocins has been induced by IPTG, a free inducer that stop the growth. In few cases, the replacement of IPTG by lactose has allowed to increase the production yield of proteins like xylanase or troponin C or cytochrome *P450* (Gombert and Kilikian, 1998; Woyski and Cupp-Vickery, 2001; Ramchuran et al., 2005). The first step of biomass production before the induction was not performed with glucose in order to avoid catabolic repression phenomena. So, the glycerol was preferred as carbon source for the biomass production. The lactose Fed-Batch fermentation process, in a reactor of 1.5 L with regulated parameters such as the pH, the temperature, the agitation, the oxygenation, and the carbon source permitted to obtain a large biomass ($O.D_{600}=51$) corresponding to 18.4 g dry weight and more than 9 g L⁻¹ protein crude extract (Table 3). In the exponential phase of growth, the specific rate (μ) was equal to 0.022 min⁻¹, so the induction with lactose did not perturb the growth of *E. coli*.

3.3. Optimization of the purification process

The fusion protein accumulated in the cytoplasm of the producer cell harvesting by centrifugation permitted the first concentration step. The cells were lysed with a “Constant Cell Disruptor”, this device allowed for more than 95% of cell lysis.

The fusion protein produced was thermostable. So, a thermal coagulation (20 min at 80 °C) was applied to the supernatant. An important part of the proteins with a high molecular weight have been eliminated (Fig. 5A).

The His tag was available in the fusion protein and facilitated the purification of the fusion protein by an Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC) step and permitted to obtain the fusion protein with a relatively good purity (example of Trx-BM1 Fig. 5B). More than 1.5 g of the 3 fusion proteins were obtained after purification (Table 3).

After this purification step, the cleavage was performed either chemically (CNBr) or enzymatically (enterokinase). The CNBr cut peptide bonds following methionine residues. Since Cbn B2 did not contain any methionine residue, a methionine residue had been added by mutagenesis just before the mature carnobacteriocin. In contrast, Cbn BM1 contained a methionine residue at the position 41, substitution of the methionine by a valine residue was realised. This mutation permitted to perform the CNBr cleavage on the muted carnobacteriocin BM1, and could increase the stability to oxidation as already demonstrated for pediocin PA-1 (Johnsen et al., 2000).

The enzymatic cleavage with enterokinase was also performed with the carnobacteriocin BM1 in order to compare antibacterial activity of Cbn BM1 and Cbn BM1M₄₁→V. In the native vector pET32a, the enterokinase site was just in downstream of the *Kpn* I site. The enterokinase site of the vector pET32a was removed with a double digestion step using *Kpn*I and *Eco*RI. The purification strategy of the carnobacteriocin BM1 required the cleavage of the fusion protein Trx-BM1 with the enterokinase. So, an enterokinase site was added just upstream of the gene encoding the mature carnobacteriocin with the oligonucleotide Cbn BM1 wt up (Table 1) during the PCR step. This construct allowed using an

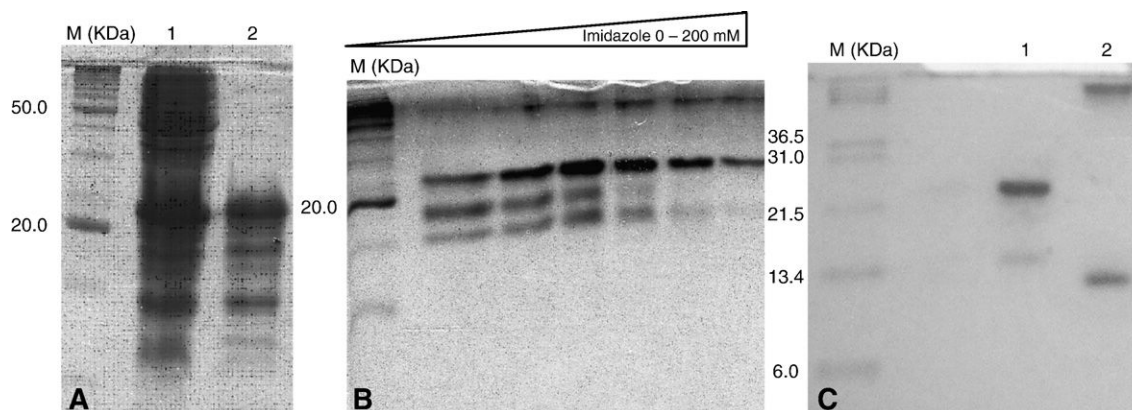


Fig. 5. SDS-PAGE electrophoregramm of the fusion protein Thioredoxin-carnobacteriocin BM1 A. Effect of thermal coagulation step. 1: before 2: after thermal coagulation B. Effect of the imidazole gradient during IMAC elution step C. Effect of the enterokinase cleavage on fusion protein. 1: before cleavage, 2: after cleavage Lane M, Size marker (Invitrogen).

enzymatic cleavage to recover the mature Cbn BM1 without any addition of amino acid residues in the N-terminal part contrary to the construction of Richard et al., (2004), which added four residue in the N-terminal part (Ala-Met-Asp-Pro).

The efficiency was around 45% with the enzymatic cleavage and more than 90% with the CNBr cleavage (Table 3). By chemical cleavage, six peptide fragments were generated, due to the presence of methionine residues in Trx-B2 and Trx-BM1M₄₁→V structure (Figs. 2–3).

After the cleavage, the mature carnobacteriocins were recovered by reverse-phase liquid chromatography. Active peptides were eluted at 89% of acetonitrile for Cbn BM1, 95% for Cbn BM1M₄₁→V and 96% for Cbn B2 and detected at 210/280 nm. Each fraction was assayed for activity against *L. ivanovii* CIP12510. Activity was identified in a single peak and the carnobacteriocin Cbn BM1, Cbn BM1M₄₁→V and Cbn B2 exhibited minimum inhibitory concentration (MIC) of 3.5 mg L⁻¹ and have a specific activity around 14,000 AU mg⁻¹. Approximately 150 mg (for Cbn BM1) and more than 300 mg (for Cbn B2 and Cbn BM1M₄₁→V) of purified bacteriocins were obtained (Table 3), four-fold higher than previous results (Yildirim et al., 2007).

4. Conclusion

Production of bacteriocins by *E. coli* was optimized in a reactor of 2 L with parameters regulated such as the pH, the temperature, the agitation, the oxygenation, and the carbon source. Purification protocols have also been optimized by using enhancing cell lysis, thermal coagulation step and a CNBr cleavage instead of enzymatic one. Our results clearly showed that production of carnobacteriocins BM1 and B2 by heterologous expression in *E. coli* BL21 (DE3) can be increased significantly and led to obtain 320 mg L⁻¹ of pure bacteriocin. These quantities are sufficient to study the structural properties or mechanism of action of these peptides.

Acknowledgements

We thank Cedric Paris, Michèle Turban and Delphine Roger for the excellent technical assistance.

References

- Ahn, C., Stiles, M.E., 1990. Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged meats. *J. Appl. Bacteriol.* 69, 302–310.
- Ausubel, 1991. *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley Interscience, New York, N.Y.
- Fimland, G., Eijsink, V.G., Nissen-Meyer, J., 2002. Mutational analysis of the role of tryptophan residues in an antimicrobial peptide. *Biochemistry* 41, 9508–9515.
- Gibbs, G.M., Davidson, B.E., Hillier, A.J., 2004. Novel expression system for large-scale production and purification of recombinant class IIa bacteriocins and its application to piscicolin 126. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3292–3297.
- Gombert, A.K., Kilikian, B.V., 1998. Recombinant gene expression in *Escherichia coli* cultivation using lactose as inducer. *J. Biotechnol.* 60, 47–54.
- Guyonnet, D., Fremaux, C., Cenatiempo, Y., Berjeaud, J.M., 2000. Method for rapid purification of class IIa bacteriocins and comparison of their activities. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1744–1748.
- Herbin, S., Mathieu, F., Brule, F., Branlant, C., Lefebvre, G., Lebrhi, A., 1997. Characteristics and genetic determinants of bacteriocin activities produced by *Carnobacterium piscicola* CP5 isolated from cheese. *Curr. Microbiol.* 35, 319–326.
- Horn, N., Martinez, M.I., Martinez, J.M., Hernandez, P.E., Gasson, M.J., Rodriguez, J.M., Dodd, H.M., 1999. Enhanced production of pediocin PA-1 and coproduction of nisin and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4443–4450.
- Jack, R.W., Wan, J., Gordon, J., Harmark, K., Davidson, B.E., Hillier, A.J., Wettenhall, R.E., Hickey, M.W., Coventry, M.J., 1996. Characterization of the chemical and antimicrobial properties of piscicolin 126, a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* JG126. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2897–2903.
- Johnsen, L., Fimland, G., Eijsink, V., Nissen-Meyer, J., 2000. Engineering increased stability in the antimicrobial peptide pediocin PA-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4798–4802.
- Kanatani, K., Oshimura, M., Sano, K., 1995. Isolation and characterization of acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1061–1067.
- Klaenhammer, T.R., 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 12, 39–85.
- Kleerebezem, M., Kuipers, O.P., De Vos, W.M., Stiles, M.E., Quadri, L.E., 2001. A two-component signal-transduction cascade in *Carnobacterium piscicola* LV17B: two signaling peptides and one sensor-transmitter. *Peptides* 22, 1597–1601.
- Leisner, J.J., Laursen, B.G., Prevost, H., Drider, D., Dalgaard, P., 2007. *Carnobacterium*: positive and negative effects in the environment and in foods. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 592–613.
- Mathieu, F., Suwandhi, I.S., Rekhif, N., Milliere, J.B., Lefebvre, G., 1993. Mesenterocin 52, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* ssp. mesenteroides FR 52. *J. Appl. Bacteriol.* 74, 372–379.
- Metivier, A., Boyaval, P., Duffès, F., Dousset, X., Compoint, J.P., Marion, D., 2000. Triton X-114 phase partitioning for the isolation of a pediocin-like bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 42–46.
- Mora, D., Scarpellini, M., Franzetti, L., Colombo, S., Galli, A., 2003. Reclassification of *Lactobacillus maltaromicus* (Miller et al., 1974) DSM 20342(T) and DSM 20344 and *Carnobacterium piscicola* (Collins et al., 1987) DSM 20730(T) and DSM 20722 as *Carnobacterium maltaromaticum* comb nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 675–678.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V., Holo, H., 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70, 113–128.
- Quadri, L.E., Yan, L.Z., Stiles, M.E., Vederas, J.C., 1997. Effect of amino acid substitutions on the activity of carnobacteriocin B2. Overproduction of the antimicrobial peptide, its engineered variants, and its precursor in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 272, 3384–3388.
- Quadri, L.E., Sailer, M., Roy, K.L., Vederas, J.C., Stiles, M.E., 1994. Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. *J. Biol. Chem.* 269, 12204–12211.
- Ramchuran, S.O., Holst, O., Karlsson, E.N., 2005. Effect of postinduction nutrient feed composition and use of lactose as inducer during production of thermostable xylanase in *Escherichia coli* glucose-limited fed-batch cultivations. *J. Biosci. Bioeng.* 99, 477–484.
- Richard, C., Drider, D., Elmorjani, K., Marion, D., 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.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Third edition. Third Edition. New York.
- Sprules, T., Kawulka, K.E., Gibbs, A.C., Wishart, D.S., Vederas, J.C., 2004. NMR solution structure of the precursor for carnobacteriocin B2, an antimicrobial peptide from *Carnobacterium piscicola*. *Eur. J. Biochem.* 271, 1748–1756.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S., Wannamaker, L.W., 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40, 722–756.
- Tahiri, I., Desbiens, M., Benech, R., Kheadr, E., Lacroix, C., Thibault, S., Ouellet, D., Fliss, I., 2004. Purification, characterization and amino

- acid sequencing of divergicin M35: a novel class IIa bacteriocin produced by *Carnobacterium divergens* M35. *Int. J. Food Microbiol.* 97, 123–136.
- Wang, Y., Henz, M.E., Gallagher, N.L., Chai, S., Gibbs, A.C., Yan, L.Z., Stiles, M.E., Wishart, D.S., Vederas, J.C., 1999. Solution structure of carnobacteriocin B2 and implications for structure-activity relationships among type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biochemistry* 38, 15438–15447.
- Woyski, D., Cupp-Vickery, J.R., 2001. Enhanced expression of cytochrome *P450s* from lac-based plasmids using lactose as the inducer. *Arch. Biochem. Biophys.* 388, 276–280.
- Yamazaki, K., Suzuki, M., Kawai, Y., Inoue, N., Montville, T.J., 2005. Purification and characterization of a novel class IIa bacteriocin, piscicocin CS526, from surimi-associated *Carnobacterium piscicola* CS526. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 554–557.
- Yang, R., Johnson, M.C., Ray, B., 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3355–3359.
- Yildirim, S., Konrad, D., Calvez, S., Drider, D., Prevost, H., Lacroix, C., 2007. Production of recombinant bacteriocin divercin V41 by high cell density *Escherichia coli* batch and fed-batch cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*

III.3 Contribution de l'article

Pour produire des quantités importantes de carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2 avec un haut degré de pureté, l'expression hétérologue a été utilisée. Elle consiste à transformer *E. coli* avec un plasmide de type pET32a codant une protéine de fusion contenant la bactériocine mature.

Différents types de construction ont été développées pour produire les peptides d'intérêt.

La carnobactériocine Cbn B2 ne contient pas de résidu méthionine. Une méthionine a été ajoutée dans la protéine de fusion juste avant la partie codant la bactériocine mature. Le clivage a été réalisé par voie chimique utilisant le CNBr qui clive les protéines au niveau de ce résidu d'acide aminé.

La carnobactériocine Cbn BM1 contient ce résidu d'acide aminé dans sa séquence (position 41) rendant le clivage chimique impossible. Le clivage a donc été réalisé par voie enzymatique *via* l'entérokinase. Le site de clivage de cette enzyme initialement présent dans le plasmide pET32a a été éliminé. Un nouveau site pour l'entérokinase a été ajouté dans la protéine de fusion juste en amont de la partie correspondant à la carnobactériocine mature. Cette modification du vecteur d'expression résout le problème de l'addition de résidus d'acides aminés dans la région N-terminale de la bactériocine mature.

Pour comparer l'efficacité des deux types de clivage, un mutant de la carnobactériocine Cbn BM1 a été construit. L'utilisation du clivage chimique est devenue possible en remplaçant le résidu méthionine initialement présent en position 41 par un résidu valine. Ce nouveau peptide est dénommé carnobactériocine Cbn BM1 M₄₁→V.

La production des carnobactériocines par des souches d'*E. coli* recombinantes a été optimisée en fermenteur en modifiant différents paramètres.

La comparaison d'efficacité des inducteurs (lactose et IPTG) réalisée en fiole sur huit heures montre un gain de production de 1,5 à 2 fois en utilisant le diholoside. Ces rendements ont été accrus car le lactose, contrairement à l'IPTG, favorise la croissance. Par conséquent, une forte densité cellulaire a été obtenue dans le réacteur, de l'ordre de 50 unités de densité optique à 600 nm, soit environ 18 g de poids sec.

La pression de sélection est maintenue par ajout d'antibiotiques de la famille des β -lactamines pour lesquels la souche est résistante. L'ampicilline n'est pas utilisable dans ce procédé car la forte densité cellulaire induit la présence d'une grande quantité de β -lactamase qui hydrolyse instantanément l'antibiotique, même si ce dernier est ajouté en continu dans la

culture. Un analogue plus stable a été utilisé, la carbénicilline, ajouté en continu à haute concentration (250 mg.L⁻¹).

Enfin, pour ne pas limiter la croissance, le milieu Terrific Broth a été amélioré, notamment en augmentant les quantités de peptones et de phosphates disponibles.

La production du peptide est réalisée sous forme d'une protéine de fusion avec une thiorédoxine afin de maintenir le produit d'intérêt dans le cytoplasme de la cellule hôte. Cette stratégie permet d'éliminer le milieu de culture, et ainsi une grande part de contaminants, par simple centrifugation. Il suffit alors de lyser les cellules pour libérer le contenu intracytoplasmique.

La bactériocine et la thiorédoxine étant thermostables, la protéine de fusion devait également l'être. Des études préliminaires ont montré que celle-ci résistait à des températures importantes. Cette capacité a permis de réaliser une coagulation thermique des protéines contaminantes. Ces dernières ont ensuite été éliminées par simple centrifugation. La protéine de fusion renferme un His-tag facilitant la purification notamment *via* une étape de chromatographie IMAC (Immobilized ion Metal Assay Chromatography).

L'étape limitante du procédé est le clivage de la protéine de fusion.

Le clivage par voie enzymatique de la carnobactériocine Cbn BM1 est simple à mettre en œuvre mais son efficacité est modérée, voisine de 40 %. Le tampon et la température de digestion ont été optimisés. Il est possible de réaliser plusieurs digestions successives pour augmenter le rendement de clivage. Le suivi de ce clivage est aisé, il est réalisable par un test d'activité en gélose car ni la thiorédoxine ni l'entérokinase ne sont toxiques.

Le clivage par voie chimique des carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn BM1 M₄₁→V est beaucoup plus efficace, de l'ordre de 90 %. Cependant, cette méthode présente certains inconvénients comme la toxicité de la réaction. Il faut ensuite éliminer le CNBr et l'acide formique restant pour réaliser les tests d'activité.

La bactériocine mature est ensuite purifiée soit par une étape de chromatographie liquide haute performance (HPLC) soit par une étape de IMAC. Cette technique permet d'obtenir plusieurs mg de peptides d'intérêt avec un degré de pureté correct.

Cette étude a permis d'obtenir de très bon rendement de production, par rapport à ceux déjà publiés, de l'ordre de 300 mg avec un volume utile de 1,5 L contre environ 70 mg par litre.

IV. Interactions entre les deux carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2 de *Carnobacterium maltaromaticum* CP5 sur des bactéries et des cellules Caco-2 cibles

IV.1 Introduction

Même si elles sont actuellement peu utilisées dans le monde industriel, les bactériocines ont un fort potentiel aussi bien en tant que molécules thérapeutiques qu'en tant que conservateurs alimentaires notamment pour prévenir les contaminations par le genre *Listeria* (O'Sullivan *et al.*, 2002 ; Leroy *et al.*, 2005 ; De Vuyst *et al.*, 2007).

De nombreuses études portent sur l'utilisation de souches appartenant au genre *Carnobacterium* pour la protection des aliments vis-à-vis de *Listeria* sp. (Brillet *et al.*, 2005 ; Nilsson *et al.*, 2005 ; Leisner *et al.*, 2007). Cependant, l'addition systématique de *Carnobacterium* sp. dans les aliments n'est pas possible. En effet, *C. maltaromaticum* produit des composés aromatiques qui peuvent altérer les caractères organoleptiques du produit. Pour pallier cet inconvénient, les carnobactériocines purifiées pourraient être directement ajoutées dans les préparations alimentaires.

Le spectre d'activité des carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2 produites et purifiées par expression hétérologue a été analysé. Les concentrations minimales inhibitrices de ces deux peptides ont été déterminées sur chaque souche sensible. L'efficacité de la combinaison des deux carnobactériocines a été étudiée en mesurant la fraction minimale inhibitrice sur les souches sensibles aux deux bactériocines. Le mode d'action de chacune des deux carnobactériocines ainsi que celui de leur combinaison a été déterminé. Enfin pour vérifier leur innocuité, la cytotoxicité individuelle ou en combinaison des carnobactériocines a été testée sur une lignée cellulaire gastro-intestinale, Caco-2.

IV.2 "Interactions between two carnobacteriocins Cbn BM1 and Cbn B2 from *Carnobacterium maltaromaticum* CP5 on target bacteria and Caco-2 cells"

Interactions between two carnobacteriocins Cbn BM1 and Cbn B2 from *Carnobacterium maltaromaticum* CP5 on target bacteria and Caco-2 cells

Jordane Jasniewski^a, Catherine Cailliez-Grimal^{a,*}, Isabelle Chevalot^b, Jean-Bernard Millière^a, Anne-Marie Revol-Junelles^a

^aNancy-Université, Institut National Polytechnique de Lorraine, Laboratoire de Science et Génie Alimentaires, 2 Avenue de la Forêt de Haye B.P. 172, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

^bNancy-Université, Institut National Polytechnique de Lorraine, Laboratoire des Science du Génie Chimique, 2 Avenue de la Forêt de Haye B.P. 172, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 October 2008

Accepted 12 January 2009

Available online xxxx

Keywords:

Bacteriocins

Synergy

Carnobacterium

Anti-*Listeria* peptide

Interactions

ABSTRACT

Two purified class IIa carnobacteriocins Cbn BM1 and Cbn B2, from *Carnobacterium maltaromaticum* CP5, were evaluated for antimicrobial activity against pathogenic, spoilage and lactic acid bacteria. Then, the presence of a synergistic mode of action of these two carnobacteriocins on *Listeria* sp., *Enterococcus* sp. and *Carnobacterium* sp. was investigated. A synergistic mode of action between Cbn BM1 and Cbn B2 on sensitive target bacteria was demonstrated using the FIC index method. Combinations of carnobacteriocins enhanced their antibacterial activities and MICs were significantly reduced, between 2- and 15-fold, by the addition of the second bacteriocin. To improve the safety of the bacteriocins as biopreservative agents, the cytotoxicity of the combination of these two bacteriocins was determined on Caco-2 cell line. However, these two peptides used alone or in combination, at concentration 100-fold higher than those required for antimicrobial activity, were not cytotoxic. This suggests that the two carnobacteriocins produced by *C. maltaromaticum* CP5 could be potential natural agents for food preservation.

© 2009 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Antimicrobial peptides (AMP) are frequently found in all vegetal and animal kingdoms, from the bacteria to the mammals. These peptides can prevent infections and/or eliminate the competitive bacterium living in the same environment than the AMPs producer (Reddy et al., 2004). Consequently, they are potential therapeutic and food preservative agents (O'Sullivan et al., 2002). The AMPs produced by the lactic acid bacteria (LAB), called bacteriocins, are ribosomally synthesized without post-translational modification and are generally active against related phylogenetically bacteria (Tagg et al., 1976). They were classified into four classes, with the class II the most represented (Klaenhammer, 1993). This class displays an anti-*Listeria* activity and shares high similarities in their primary sequence with an N-terminal consensus sequence (YNGGV) and presents two cysteine residues involved in a disulfide bridge (Fimland et al., 2005). Among the class IIa bacteriocins synthesized by LAB strains, *Carnobacterium* is an important producer secreting around 12 distinct bacteriocins (Leisner et al., 2007). *Carnobacterium maltaromaticum* CP5 isolated from a French mold ripened cheese produces two carnobacteriocins, CP51 and CP52 (Herbin et al., 1997). CP51 is similar to carnobacteriocin BM1

(Cbn BM1) from *C. piscicola* LV17, isolated from vacuum-packed meat (Ahn and Stiles, 1990) and its derivative *C. piscicola* LV17B (Quadri et al., 1994) and to piscicocin V1b synthesized by *C. piscicola* V1 (Bhugaloo-Vial et al., 1996). Other strains of *C. maltaromaticum* produced Cbn BM1 like *C. maltaromaticum* UAL26 (Gursky et al., 2006). CP52 is similar to carnobacteriocins B2 (Cbn B2) (Quadri et al., 1994). These bacteriocins, Cbn BM1 (43 AA) and Cbn B2 (48 AA), are active against Gram-positive bacteria, including *Carnobacterium* sp., *Enterococcus* sp. and *Listeria* sp. strains (Mathieu et al., 1993; Quadri et al., 1994).

Among the potential strategies to enhance the LAB bacteriocin activity, the use of combinations of them was proposed. Synergistic action between two bacteriocins produced by the same strain has been already reported for the two bacteriocins (mesenterocins 52A and 52B) produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 (Limonet et al., 2004; Revol-Junelles et al., 1996) and for enterocins A and B produced by *Enterococcus faecium* T136 (Casaus et al., 1997).

In this paper, the spectra of carnobacteriocins Cbn BM1 and Cbn B2 were determined to confirm the natural antimicrobial activity of the two purified peptides. The presence of a synergistic mode of action of these two carnobacteriocins on *Listeria* sp., *Enterococcus* sp. and *Carnobacterium* sp. was investigated. To ensure their safety as biopreservative agents, the cytotoxicity of the combination of these two peptides was determined on Caco-2 cell line.

* Corresponding author. Tel.: +33 (0)3 83 59 58 84; fax: +33 (0)3 83 59 57 71.
E-mail address: Catherine.Cailliez@ensaia.inpl-nancy.fr (C. Cailliez-Grimal).

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and culture conditions

Carnobacterium, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* and *Weissella* strains were purchased from different public collections (Table 1). The strains from *Carnobacterium* and *Listeria* genus were cultivated in trypticase soy broth (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) supplemented with 6 g L⁻¹ of bacto-yeast extract (Biokar) (TSB-YE); *Enterococcus*, *Staphylococcus* and *Streptococcus* strains were cultivated in Elliker (Biokar) broth. *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Weissella* strains were cultivated in MRS (Biokar). Incubation was performed either at 25, 30 or 37 °C. All strains were stored in appropriate culture medium supplemented with glycerol (10%) at -30 °C and propagated twice before use. Agar medium was prepared by addition of 15 g L⁻¹ of bacteriological agar. Enumerations were determined by decimal dilutions of the cultures and plated on appropriate agar medium using a spiral plating (Whitley Automatic Spiral Plater, WASP 2, AES Laboratoire).

2.2. Bacteriocins

Carnobacteriocins Cbn BM1 and Cbn B2 from *C. maltaromaticum* CP5 were produced and purified by heterologous expression in a previous work (Jasniewski et al., 2008).

2.3. Determination of antibacterial activity

Antimicrobial activity was determined by the agar well diffusion method (Mathieu et al., 1993). Bacterial strains were inoculated in the appropriate solid medium (1.2% bacteriological agar, Biokar) supplemented with 1% Tween 80 (Merck, Darmstadt, Germany) and poured in Petri dishes. Cbn BM1 and Cbn B2 bacteriocins were prepared in phosphate buffer (5 mM, pH 6.5) to a final concentration of 250 mg L⁻¹. A combination of these two carnobacteriocins was prepared in the same buffer to a

concentration of 125 µg L⁻¹ for each bacteriocin. The supernatant of a 16 h culture of *C. maltaromaticum* CP5 was harmed at 80 °C during 20 min and filtered through a 0.22 µm pore diameter membrane.

A 25 µL volume of Cbn BM1, Cbn B2, combination of Cbn BM1/Cbn B2 or of the treated supernatant of *C. maltaromaticum* CP5 was placed into a 5-mm diameter agar well. Agar plates were allowed to diffuse overnight at 4 °C and then were incubated at the optimal temperature of each target strains for at least 10 h and diameters of inhibition zones were measured. Assays were performed in triplicate.

2.4. Determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) and the fractional inhibitory concentration (FIC)

For strains susceptible to both carnobacteriocins, the minimal inhibitory concentrations (MIC) of the Cbn BM1 and Cbn B2 were determined in 96-wells plates (Nunc, Roskilde, Denmark) containing 100 µL of the tested peptides. Phosphate buffer solutions (5 mM, pH 6.5) containing the nine combinations 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0 mg L⁻¹ of Cbn BM1 and of CbnB2 were prepared. For each combination, 100 µL of the appropriate 2X culture media inoculated with the susceptible strains with an initial optical density value at 660 nm of 0.02 were added. Inhibitory activities of these 81 bacteriocin(s) suspensions were determined by measuring O.D₆₆₀ values after 18 h of incubation at the optimal temperature of each tested culture (Table 1).

Inhibition data were expressed in fractional inhibitory concentrations (FIC) (Hall et al., 1983). $FIC_{Cbn\ BM1} = (MIC\ of\ Cbn\ BM1\ with\ MIC\ of\ Cbn\ B2) / MIC\ of\ Cbn\ BM1$. The FIC index was calculated with FICs for individual carnobacteriocin: $FIC_{index} = FIC_{Cbn\ BM1} + FIC_{Cbn\ B2}$. A FIC_{index} near 1 indicates additivity, <1 synergy, and >1 antagonism of the bacteriocins combination.

For Caco-2 cells, the followed combinations have been tested: 100 mg L⁻¹ of Cbn BM1 without Cbn B2, 100 mg L⁻¹ of Cbn B2 without Cbn BM1, 75 mg L⁻¹ of Cbn BM1 with 25 mg L⁻¹ of Cbn B2, 75 mg L⁻¹ of Cbn B2 with 25 mg L⁻¹ of Cbn BM1, 65 mg L⁻¹ of Cbn BM1 with 35 mg L⁻¹ of Cbn B2, 65 mg L⁻¹ of Cbn B2 with 35 mg L⁻¹ of Cbn BM1, 50 mg L⁻¹ of Cbn BM1 with 50 mg L⁻¹ of Cbn B2 and 25 mg L⁻¹ of Cbn BM1 with 25 mg L⁻¹ of Cbn B2.

Table 1

Activity spectra of carnobacteriocins Cbn BM1, Cbn B2, used in association and of a culture supernatant of the productive strain *C. maltaromaticum* CP5. ATCC, American Type Culture Collection, Mannassas, USA, CIP, Collection de l'Institut Pasteur, Paris, France; DSM, Deutsche Sammlung von Mikro-Organismen und Zellkulturen, Göttingen, Germany; SLCC, Special *Listeria* Culture Collection, University of Wurzburg, Germany; LMA and CP, Private collection, Laboratoire de Microbiologie Alimentaire, ENSAIA-INPL Nancy, France.

Target strains		Incubation temperature (°C)	Inhibition zone diameter (mm)			
Species	Strain designation		BM1	B2	BM1 + B2	CP5
<i>Carnobacterium divergens</i>	DSM 20623 ^T	30	+++ ^a	++	+++ ^a	+++ ^a
<i>C. gallinarum</i>	DSM 4847	25	+++	++	++	+++
<i>C. mobile</i>	DSM 4848 ^T	30	+++ ^a	++	++	++
<i>C. maltaromaticum</i>	LMA 28	30	0	0	0	0
	DSM 20730 ^T	30	+++ ^a	++	+++ ^a	+++
	CP 5	30	0	0	0	0
<i>C. viridans</i>	CIP 107728 ^T	25	0	0	0	0
<i>Enterococcus durans</i>	CIP 55125 ^T	37	+++ ^a	++	+++	+++ ^a
<i>E. faecalis</i>	CIP 76117	37	+++ ^a	++	++	+++
<i>E. faecium</i>	LMA 63	37	0	+++ ^a	+++ ^a	++
	DSM 20477 ^T	37	0	++	++	++
<i>Lactobacillus casei subsp. casei</i>	DSM 20011 ^T	30	0	0	0	0
<i>Lb. fermentum</i>	DSM 20052 ^T	37	0	0	0	0
<i>Lb. helveticus</i>	DSM 20075 ^T	37	0	0	0	0
<i>Lb. plantarum</i>	DSM 20174	30	0	0	0	0
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	CIP 7056 ^T	30	0	0	0	0
<i>Leuconostoc citreum</i>	CIP 103405	30	0	0	0	0
<i>Ln. mesenteroides subsp. dextranicum</i>	LMA 131	30	0	0	0	0
	DSM 20484	30	0	0	0	+ ^a
	DSM 20202	30	0	0	0	+ ^a
<i>Ln. mesenteroides subsp. lactis</i>	LMA 7	30	0	0	0	0
	LMA 7AR	30	0	+ ^a	0	+ ^a
	CIP 54170	30	0	0	0	0
<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	CIP 103316 ^T	30	0	0	0	0
<i>L. grayi</i>	CIP 7818	30	+++ ^a	+++ ^a	+	+++ ^a
<i>L. innocua</i>	CIP 12511	30	+++ ^a	+++ ^a	++	++
<i>L. ivanovii</i>	CIP 12510	30	+++ ^a	+++ ^a	+++ ^a	+++ ^a
<i>L. monocytogenes</i>	CIP 7831	37	+++ ^a	+++ ^a	+++ ^a	+ ^a
	ATCC 15313	37	+	+++ ^a	+++ ^a	+++ ^a
<i>Listeria seeligeri</i>	SLCC 3954	37	+++ ^a	+++ ^a	+++ ^a	+++
<i>Staphylococcus aureus</i>	CIP 7625 ^T	37	0	0	0	0
<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSM 20617	37	0	0	0	0
<i>Weissella paramesenteroides</i>	DSM 20288 ^T	30	0	0	0	0

0, no inhibition; +, ≤ 2 mm; ++, between 2 and 8 mm; +++, > 8 mm.

^a Regrowth in the inhibition area.

2.5. Determination of the mode of action

A 96-wells plates containing appropriate media were inoculated with a 16 h subculture of *Carnobacterium divergens* DSM 20623, *Enterococcus faecalis* CIP 76117, *Listeria grayi* CIP 6818, *Listeria innocua* CIP 12511 or *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 strains in order to reach an O.D₆₆₀ value of 0.01. Carnobacteriocins were added separately or together at different concentrations (MIC or FIC). Bacterial growth was monitored by spectrophotometric measurements (O.D₆₆₀) during 48 h with a Titertek Multiscan MCC/340 (Huntsville, Alabama, USA). Assays were performed in triplicate.

2.6. Cell line and medium

The human colon adenocarcinoma cell line Caco-2 was kindly provided by URA-FPA laboratory (Nancy-France) and maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma, St. Quentin Fallavier, France) supplemented with 10% foetal calf serum and 1% of nonessential aminoacids. Cells were maintained in a humidified atmosphere of 5 % CO₂ in air; 1.10⁶ cells were seeded in 25 cm² tissue culture flasks and routine renewal of cell stocks was carried out twice weekly by removing cells with a solution containing trypsin-EDTA (Sigma, St. Quentin Fallavier, France). The culture medium was changed every 48 h.

2.7. Cell counting and MTT assay

Cytotoxicity was measured by both growth kinetics evaluation and MTT assay ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma, St. Quentin Fallavier, France). Caco-2 cells (5 × 10⁴/well) were plated in 96-wells plates with 180 µL working volume and incubated for 24 h to allow the cells to attach, before treatment with bacteriocins. Cells were treated with 100 mg L⁻¹ concentration of each peptide dissolved in PBS for 48 h. The growth kinetics were determined using the Cellscreen® system (Innovatis, Bielefeld, Germany). This apparatus can take automatically pictures of exactly the same cells in culture over time and the percentage of area covered with cells was estimated by automated image analysis of each picture. This non-invasive method allowed a daily evaluation of the cell growth and morphology. The statistical reliability of results obtained using this apparatus was previously demonstrated (Brinkmann et al., 2002).

After incubation for specified time at 37 °C in a humidified incubator, MTT (2 mg mL⁻¹ in PBS) was added to each well and incubated for 4 h. The MTT solution was removed from the well by aspiration. After careful removal of the medium, 200 µL of isopropanol was added to each well, and plates were shaken. The absorbance was recorded on a microplate reader at the wavelength of 540 nm. The effect of each compound on growth inhibition was assessed as percent cell viability where PBS treated cells were taken as 100% viable. Octuplicate wells were assayed for each condition, and mean as well as standard deviations were determined.

2.8. Statistical analysis

All results were analyzed using ANOVA (Excel, Microsoft).

3. Results

3.1. Determination of antibacterial activity

The antimicrobial spectrum (Table 1) showed that *Carnobacterium* sp. were sensitive to the both peptides except *Carnobacterium viridans* CIP 107728^T, *C. maltaromaticum* LMA 28 and the producer stains *C. maltaromaticum* CP5. All the tested *Listeria* sp. strains were

sensitive and presented a regrowth in the inhibition area suggesting a initial bacteriostatic phenomenon. The tested *Enterococcus* sp. were sensitive to the both carnobacteriocins except *E. faecium* (LMA 63 and DSM 20477^T) which were only susceptible to Cbn B2. The others LAB strains tested and *Staphylococcus aureus* CIP7625^T were insensitive to these carnobacteriocins (Table 1).

3.2. Determination of the minimal concentration inhibitory (MIC) and fractional inhibitory concentration (FIC)

The MIC and the FIC_{index} were determined for each strain susceptible to both Cbn BM1 and Cbn B2 (Table 2). The four sensitive *Carnobacterium* strains tested showed the same MIC values for Cbn BM1 (0.625 mg L⁻¹) and Cbn B2 (1.25 mg L⁻¹), values lower than those obtained with *Enterococcus* sp. and *Listeria* sp. (2–4 mg L⁻¹) showing difference of susceptibility (Table 2). When the both carnobacteriocins were added in combination the active concentration of each peptide decreased around 4–8-fold for Cbn BM1 and around 2–15-fold for Cbn B2. An example of the isobologram obtained with *L. innocua* CIP 12511 is shown in Fig. 1. Similar isobolograms were obtained with the other tested strains (data not shown). In all cases, combination of Cbn BM1 with CbnB2 presented a FIC_{index} <1 which confirmed a synergistic mode of action between these both peptides produced by *C. maltaromaticum* CP5.

3.3. Determination of the mode of action

The mode of action of the two carnobacteriocins was determined alone or in combinations at MIC or FIC concentrations. An example of results obtained with *L. innocua* CIP 12511 is shown in Fig. 2. Cbn BM1 or Cbn B2 had a bacteriostatic effect on the target strain at MIC values. No growth was detectable in the first 24 h of incubation, regrowth was observed after 32 h. No effect of the carnobacteriocins tested alone at the FIC values (0.5 mg L⁻¹) was detected on the growth rate. On the other hand, when the two bacteriocins were added in combination (FIC values) a bacteriostatic effect was observed (no growth during 32 h of culture) with all tested strains (data not shown).

3.4. Cell growth and viability

With concentrations of Cbn BM1 or Cbn B2, 100-fold higher than concentrations used on target bacteria to observe a bacteriostatic effect, no significant effect was observed on the growth rate or on the viability after 48 h of contact (Fig. 3). Moreover, no synergistic effect of the carnobacteriocins together was observed on Caco-2 cells line. However, the highest effect on the growth was observed with Cbn B2, but both the growth rate and the viability were around of 80% of the values obtained with the standard

Table 2

Minimal inhibitory concentration (MIC) expressed in mg L⁻¹ and fractional inhibitory concentration (FIC) values of carnobacteriocins Cbn BM1 and Cbn B2.

Bacterial species	Minimal inhibitory concentration (mg L ⁻¹)		FIC _{index}	Minimal synergy concentration (mg L ⁻¹)	
	BM1	B2		BM1	B2
<i>Carnobacterium divergens</i> DSM 20623	0.625	1.25	0.26	0.08	0.16
<i>C. gallinarum</i> DSM 4847	0.625	1.25	0.38	0.16	0.16
<i>C. maltaromaticum</i> DSM 20730	0.625	1.25	0.26	0.08	0.16
<i>C. mobile</i> DSM 4848	0.625	1.25	0.31	0.16	0.08
<i>Enterococcus durans</i> CIP 55125	2	2	0.38	0.50	0.25
<i>E. faecalis</i> CIP 76117	2	4	0.50	0.50	1.00
<i>Listeria grayi</i> CIP 6818	4	4	0.75	1.00	2.00
<i>L. innocua</i> CIP 12511	4	4	0.26	0.50	0.50
<i>L. ivanovii</i> CIP 12510	4	4	0.38	1.00	0.50
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	4	4	0.50	1.00	1.00
<i>L. monocytogenes</i> CIP 7831	4	4	0.50	1.00	1.00
<i>L. seeligeri</i> SLCC 3954	4	4	0.50	1.00	1.00

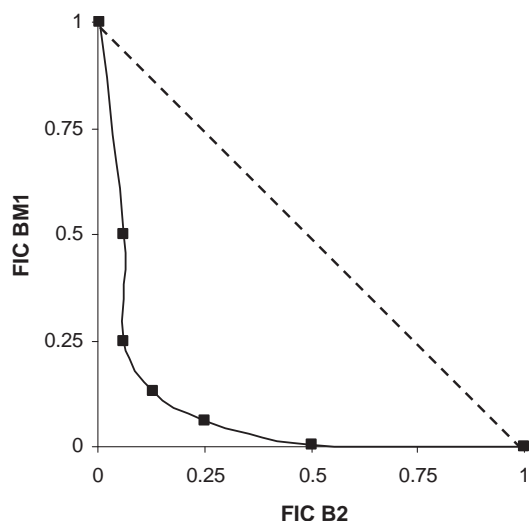


Fig. 1. FIC isobologram for combinations of CbnBM1 and CbnB2 against *Listeria innocua* CIP 12510. The additive line is drawn in dotted line. SD < 5%.

232 culture performed in presence of PBS. These values were not signifi-
 233 cant with the important concentrations used. Indeed, IC50 values
 234 can not be determined.

235 **4. Discussion**

236 The two purified carnobacteriocins Cbn BM1 and Cbn B2 pre-
 237 sented an antimicrobial activity against pathogenic or spoilage
 238 bacterial genus as described in the literature (Bhugaloo-Vial et
 239 al., 1996; Quadri et al., 1994). It is surprising that these two bacte-
 240 riocins produced by the same bacterium exhibit spectra with only
 241 slight differences although their respective structures are less re-
 242 lated as compared to other bacteriocins (Bhugaloo-Vial et al.,
 243 1996; Quadri et al., 1994). Even if they are classed into the same
 244 subgroup 3 (Fimland et al., 2005), their C-terminal half is more di-
 245 verse and they share only 5 conserved amino acid residues in their
 246 sequences.

247 Many studies have shown an increase of antimicrobial peptide
 248 activity in association with antibiotics or antimicrobial factors as
 249 pH, temperature or osmolarity (Modi et al., 2000; Nykanen et al.,
 250 2000; Zapico et al., 1998). In some cases, synergistic effects be-
 251 tween two bacteriocins were reported against strains susceptible
 252 to both bacteriocins tested (Bouttefroy and Millièrre, 2000; Hanlin

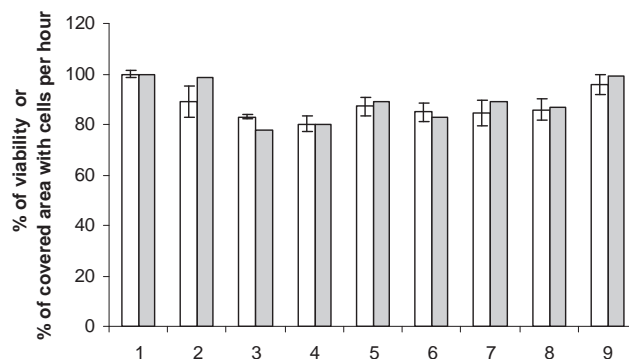


Fig. 3. Effect of carnobacteriocins Cbn BM1 and Cbn B2 on the viability and the growth of the CaCo-2 cell line. □: determination by MTT assay of the percentage of viability after 48 h of growth in presence of a combination of carnobacteriocins Cbn BM1 and Cbn B2. The percentage of viability is normalized at 100% with the culture obtained with PBS. ■: determination of the rate of covered culture area with cells expressed in percentage of the covered area obtained after 24 h of growth with the culture in PBS normalized at 100%. These measures were purchased with Cellscreen®, SD ≤ 5%. 1: PBS; 2: BM1 100 mg L⁻¹; 3: B2 100 mg L⁻¹; 4: BM1 25 mg L⁻¹/B2 75 mg L⁻¹; 5: BM1 35 mg L⁻¹/B2 650 mg L⁻¹; 6: BM1 50 mg L⁻¹/B2 50 mg L⁻¹; 7: BM1 65 mg L⁻¹/B2 35 mg L⁻¹; 8: BM1 75 mg L⁻¹/B2 25 mg L⁻¹ and 9: BM1 25 mg L⁻¹/B2 25 mg L⁻¹.

253 et al., 1993; Moll et al., 1999; Mulet-Powell et al., 1998; Vignolo et
 254 al., 2000), but in other cases, no effect was observed (Eijsink et al.,
 255 1998; Mulet-Powell et al., 1998). In this paper, the synergy be-
 256 tween Cbn BM1 and Cbn B2 has been demonstrated. MICs values
 257 were significantly reduced by the addition of the second bacterio-
 258 cin. Indeed, the determination of FIC showed that the combination
 259 of Cbn BM1 and Cbn B2 required lower concentrations of each bacte-
 260 riocin (2–15-fold less) than each carnobacteriocin separately and
 261 to obtain a bacteriostatic inhibition of *Listeria* sp., *Enterococcus* sp.
 262 and *Carnobacterium* sp. It is known that interaction with a receptor,
 263 the mannose transportor, is a critical feature of the mechanism of
 264 action of type IIa bacteriocins (Fimland et al., 1998; Yan et al.,
 265 2000). In our case, the synergistic mode of action indicated that
 266 there is no competition for the same receptor. This may also be
 267 due to non-specific effects on the membrane as shown with an-
 268 other class IIa bacteriocin, such as the mesenterocin 52A on *Listeria*
 269 strains (Jasniewski et al., 2008a,b).

270 This synergistic combination of bacteriocins was tested on cell
 271 models. It is known that the class I lantibiotic Nisin A, a food pre-
 272 servative, presents a low cytotoxicity towards gastrointestinal cell
 273 models (Caco-2 and HT-29) with concentration of 100 μM, a value

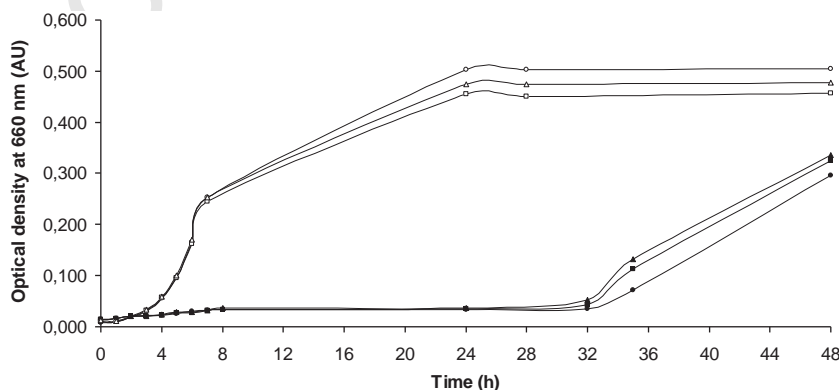


Fig. 2. Mode of action on *Listeria innocua* CIP 12510 of carnobacteriocins BM1 and B2. (○): without bacteriocin; (□): in presence of CbnB2 to FIC (0.16 mg L⁻¹); (△): in presence of Cbn BM1 to FIC (0.08 mg L⁻¹); (▲): in presence of CbnB2 to MIC (1.25 mg L⁻¹); (■): in presence of Cbn BM1 to MIC (0.625 mg L⁻¹); (●): in presence of the combination of CbnBM1 and CbnB2 in the FIC condition (0.08 and 0.16 mg L⁻¹, respectively). MIC: minimal inhibitory concentration; FIC: fractional inhibitory concentration. SD ≤ 5%.

1000-fold higher than those used for an antimicrobial activity bacteria (Maher and McClean, 2006). In this paper, the cytotoxicity of Cbn BM1 and Cbn B2, separately or in combination, was investigated on Caco-2 cells with the same concentration than Nisin A. This concentration was very important, really far from the physiological quantities produced by *C. maltaromaticum* CP5. No significant effect on growth rate or viability was detected, even with a combination of Cbn BM1 or Cbn B2. This result could be explained by the absence of a specific receptor of these carnobacteriocins on the cytoplasmic membrane leading to a low adsorption of these peptides on the targeted cells or by the difference of the cytoplasmic composition between prokaryotic and eukaryotic cells, e.g. cholesterol (Crane and Tamm, 2004). Like the nisin, Cbn BM1 and Cbn B2 were not cytotoxic for gastrointestinal cells; so these peptides could be considered as potential biopreservatives to prevent a growth by *Listeria* sp. Furthermore, the existence of a synergistic mode of action between Cbn BM1 and Cbn B2 permit to use very low levels of each bacteriocin.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

We thank Michèle Turban and Delphine Roger for their excellent technical assistance.

References

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

Bhugalo-Vial, P., Dousset, X., Metivier, A., Sorokine, O., Anglade, P., Boyaval, P., Marion, D., 1996. Purification and amino acid sequences of piscicocins V1a and V1b, two class IIa bacteriocins secreted by *Carnobacterium piscicola* V1 that display significantly different levels of specific inhibitory activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4410–4416.

Bouttefroy, A., Millière, J.B., 2000. Nisin-curvaticin 13 combinations for avoiding the regrowth of bacteriocin resistant cells of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. *Int. J. Food Microbiol.* 62, 65–75.

Brinkmann, M., Lütkemeyer, D., Gudermann, F., Lehmann, J., 2002. New technologies for automated cell counting based on optical image analysis 'the Cellscreen'. *Cytotechnology* 38, 119–127.

Casaus, P., Nilsen, T., Cintas, L.M., Nes, I.F., Hernandez, P.E., Holo, H., 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* 143 (Pt 7), 2287–2294.

Crane, J.M., Tamm, L.K., 2004. Role of cholesterol in the formation and nature of lipid rafts in planar and spherical model membranes. *Biophys. J.* 86, 2965–2979.

Eijsink, V.G., Skeie, M., Middelhoven, P.H., Brurberg, M.B., Nes, I.F., 1998. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3275–3281.

Fimland, G., Jack, R., Jung, G., Nes, I.F., Nissen-Meyer, J., 1998. The bactericidal activity of pediocin PA-1 is specifically inhibited by a 15-mer fragment that spans the bacteriocin from the center toward the C terminus. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 5057–5060.

Fimland, G., Johnsen, L., Dalhus, B., Nissen-Meyer, J., 2005. Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. *J. Pept. Sci.* 11, 688–696.

Gursky, L.J., Martin, N.I., Derksen, D.J., Van Belkum, M.J., Kaur, K., Vederas, J.C., Stiles, M.E., McMullen, L.M., 2006. Production of piscicolin 126 by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL26 is controlled by temperature and induction peptide concentration. *Arch. Microbiol.* 186, 317–325.

Hall, M.J., Middleton, R.F., Westmacott, D., 1983. The fractional inhibitory concentration (FIC) index as a measure of synergy. *J. Antimicrob. Chemother.* 11, 427–433.

Hanlin, M.B., Kalchayanand, N., Ray, P., Ray, B., 1993. Bacteriocins of lactic acid bacteria in combination have greater antibacterial activity. *J. Food Prot.* 56, 252–255.

Herbin, S., Mathieu, F., Brule, F., Branlant, C., Lefebvre, G., Lebrihi, A., 1997. Characteristics and genetic determinants of bacteriocin activities produced by *Carnobacterium piscicola* CP5 isolated from cheese. *Curr. Microbiol.* 35, 319–326.

Jasniowski, J., Cailliez-Grimal, C., Gelhaye, E., Revol-Junelles, A.M., 2008a. Optimization of the production and purification processes of carnobacteriocins Cbn BM1 and Cbn B2 from *Carnobacterium maltaromaticum* CP5 by heterologous expression in *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Methods* 73, 41–48.

Jasniowski, J., Cailliez-Grimal, C., Younsi, M., Millière, J.B., Revol-Junelles, A.M., 2008. Fluorescence anisotropy analysis of the mechanism of action of mesenterocin 52A: speculations on antimicrobial mechanism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*

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

Leisner, J.J., Laursen, B.G., Prevost, H., Drider, D., Dalgaard, P., 2007. Carnobacterium: positive and negative effects in the environment and in foods. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 592–613.

Limonet, M., Revol-Junelles, A.M., Cailliez-Grimal, C., Millière, J.B., 2004. Synergistic mode of action of mesenterocins 52A and 52B produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR 52. *Curr. Microbiol.* 48, 204–207.

Maher, S., McClean, S., 2006. Investigation of the cytotoxicity of eukaryotic and prokaryotic antimicrobial peptides in intestinal epithelial cells in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 71, 1289–1298.

Mathieu, F., Michel, M., Lefebvre, G., 1993. Properties of a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* CP5. *Biotechnol. Lett.* 15, 587–590.

Modi, K.D., Chikindas, M.L., Montville, T.J., 2000. Sensitivity of nisin-resistant *Listeria monocytogenes* to heat and the synergistic action of heat and nisin. *Letts. Appl. Microbiol.* 30, 249–253.

Moll, G.N., Van Den Akker, E., Hauge, H.H., Nissen-Meyer, J., Nes, I.F., Konings, W.N., Driessen, A.J., 1999. Complementary and overlapping selectivity of the two-peptide bacteriocins plantaricin EF and JK. *J. Bacteriol.* 181, 4848–4852.

Mulet-Powell, N., Lacoste-Armynot, A.M., Vinas, M., Simeon De Buochberg, M., 1998. Interactions between pairs of bacteriocins from lactic bacteria. *J. Food Prot.* 61, 1210–1212.

Nykanen, A., Weckman, K., Lapvetelainen, A., 2000. Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked rainbow trout by nisin and sodium lactate. *Int. J. Food Microbiol.* 61, 63–72.

O'sullivan, L., Ross, R.P., Hill, C., 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* 84, 593–604.

Quadri, L.E., Sailer, M., Roy, K.L., Vederas, J.C., Stiles, M.E., 1994. Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. *J. Biol. Chem.* 269, 12204–12211.

Reddy, K.V., Yedery, R.D., Aranha, C., 2004. Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int. J. Antimicrob. Agents* 24, 536–547.

Revol-Junelles, A.M., Mathis, R., Krier, F., Fleury, Y., Delfour, A., Lefebvre, G., 1996. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 synthesizes two distinct bacteriocins. *Letts. Appl. Microbiol.* 23, 120–124.

Tagg, J.R., Dajani, A.S., Wannamaker, L.W., 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40, 722–756.

Vignolo, G., Palacios, J., Farias, M.E., Sesma, F., Schillinger, U., Holzzapfel, W., Oliver, G., 2000. Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria* species in broth and meat system. *Curr. Microbiol.* 41, 410–416.

Yan, L.Z., Gibbs, A.C., Stiles, M.E., Wishart, D.S., Vederas, J.C., 2000. Analogues of bacteriocins: antimicrobial specificity and interactions of leucocin A with its enantiomer, carnobacteriocin B2, and truncated derivatives. *J. Med. Chem.* 43, 4579–4581.

Zapico, P., Medina, M., Gaya, P., Nunez, M., 1998. Synergistic effect of nisin and the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* in skim milk. *Int. J. Food Microbiol.* 40, 35–42.

IV.3 Contribution de l'article

Le spectre d'activité des deux carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2 confirme les résultats déjà publiés (Quadri *et al.*, 1994 ; Bhugaloo-Vial *et al.*, 1996). Par conséquent, les carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2 obtenues par production hétérologue chez *E. coli* sont identiques à celles produites naturellement par *C. maltaromaticum* CP5.

Toutes les espèces de *Carnobacterium* testées sont sensibles aux deux carnobactériocines sauf *C. viridans* CIP 107728^T et les deux espèces de *C. maltaromaticum* (CP5 et LMA 28). Toutes les *Listeria* sont sensibles aux deux carnobactériocines. Cependant, dans tous les cas, une reprise de croissance est observée dans la zone d'inhibition. Les représentants du genre *Enterococcus* sont sensibles aux deux bactériocines mis à part *E. faecium* LMA 63 et DSM 20477^T qui sont sensibles uniquement à la carnobactériocine Cbn B2. Malgré des séquences différentes, notamment dans la région C-terminale, les deux carnobactériocines ont un spectre d'activité quasiment identique. Il semble difficile dans le cas présent d'établir des relations entre la structure et la fonction.

Les espèces du genre *Carnobacterium* présentent respectivement une CMI de 0,625 mg.L⁻¹ et de 1,25 mg.L⁻¹ pour les carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2. Les souches de *Listeria* et d'*Enterococcus*, moins sensibles à ces bactériocines, ont des valeurs de CMI supérieures à celles précédemment citées ; de plus ces valeurs sont variables entre les différentes espèces testées.

La présence d'une synergie d'action entre les carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2 a été étudiée sur toutes les souches sensibles aux deux peptides. La détermination de la fraction de concentration inhibitrice (FIC) a permis de montrer un effet synergique des carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2. De plus, les quantités actives de chaque bactériocine utilisée en combinaison sont moindres que celles mises en œuvre individuellement. En effet, en synergie, la concentration en carnobactériocine Cbn BM1 est réduite d'un facteur 4 à 8 et celle en carnobactériocine Cbn B2 d'un facteur 2 à 15.

Seule ou en combinaison optimale, les carnobactériocines ont le même mode d'action. Elles stoppent la croissance et sont bactériostatiques. Cependant, la combinaison des deux peptides est plus efficace alors que la quantité en bactériocines est plus faible. En effet, avec les bactériocines seules, une bactériostase de 24 h est observée avec une reprise de croissance, alors que l'effet bactériostatique dure 32 h avec les carnobactériocines en combinaison. Cet effet synergique peut être dû à une augmentation de l'efficacité du mécanisme d'action. Plusieurs hypothèses peuvent être émises : (i) un pore formé par deux types de bactériocines

est plus stable ; (ii) une carnobactériocine peut provoquer des fuites d'anions tandis que l'autre des fuites de cations augmentant ainsi leur efficacité, d'où une bactériostase plus longue ; (iii) l'adsorption d'une carnobactériocine favorise celle de l'autre, soit en modifiant la conformation d'un récepteur, soit en favorisant les interactions avec les phospholipides de la membrane cytoplasmique.

A des concentrations 100 fois supérieures par rapport à celles actives contre les bactéries, les carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2, même lorsqu'elles sont utilisées en combinaison, n'ont pas d'effet significatif sur la viabilité ni sur le taux de croissance des cellules de la lignée Caco-2. Les concentrations utilisées sont très importantes et jamais produites naturellement et l'IC₅₀ n'est jamais atteinte. La présence d'une cytotoxicité des carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2 peut être exclue.

Tout comme la nisine, qui est la seule bactériocine utilisée en tant que conservateur, les carnobactériocines ne sont pas cytotoxiques pour des cellules gastro-intestinales. Par conséquent elles pourraient être utilisées pour prévenir les contaminations ou les altérations provoquées par *Listeria* sp. et *Enterococcus* sp. De plus, *C. maltaromaticum* CP5 étant un contaminant naturel des fromages affinés à pâte molle, cette souche pourrait être utilisée pour protéger biologiquement certains aliments.

*Conclusion générale et
Perspectives*

Chapitre III : Conclusion générale et perspectives

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans la continuité des recherches menées au laboratoire sur la compréhension des mécanismes d'action de peptides antibactériens, notamment la méSENTÉROCINE 52A. Pour étudier ces mécanismes, deux approches ont été utilisées. La première repose sur l'étude de la pénétration de la bactériocine dans la membrane des cellules cibles et de ses conséquences sur le fonctionnement de cette dernière. La seconde approche consiste en l'étude des phénomènes de résistance pour comprendre la nature des interactions entre la méSENTÉROCINE 52A et les cellules naturellement ou rendues résistantes.

Les résultats obtenus avec la méSENTÉROCINE 52A doivent être comparés avec ceux obtenus avec des bactériocines de la sous-classe IIa. Les peptides retenus pour cette comparaison sont les carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2 qui ont été produites et purifiées à partir de souches recombinantes d'*E. coli*. Le mode d'action de ces deux peptides a été caractérisé.

L'étude du mécanisme d'action de la méSENTÉROCINE 52A sur deux espèces de *Listeria* a permis d'entrevoir un nouvel aspect dans le mécanisme d'action de peptides antibactériens produits par des bactéries lactiques. Certains articles mentionnent la formation de pores par les bactériocines appartenant à la sous-classe IIa (Ennahar *et al.*, 2000 ; Drider *et al.*, 2006), d'autres montrent une insertion partielle de ces peptides antibactériens dans la bicouche lipidique (Castano *et al.*, 2005). Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que les modèles membranaires utilisés dans ces études sont variables. Il s'agit soit de cellules bactériennes appartenant à une seule espèce, soit de membranes artificielles ne mimant pas la complexité d'une cellule dans son intégrité. Les résultats contradictoires obtenus pourraient n'être en fait que le reflet de la grande complexité du mécanisme d'action des bactériocines.

Les résultats obtenus lors de cette thèse suggèrent qu'il existe pour la méSENTÉROCINE 52A deux mécanismes d'action distincts dépendants de l'espèce de *Listeria* ciblée, chacun aboutissant à une bactériostase. Le mécanisme d'action de cette bactériocine serait donc souche-dépendant. Le mécanisme d'action serait fondé sur le dysfonctionnement de la membrane, entraînant dans certains cas, selon les caractères physico-chimiques de la bicouche, la formation de pores. La formation de pores ne serait pas obligatoire pour observer un effet bactériostatique.

Certains auteurs ont suggéré que les différents mécanismes observés dans les diverses études seraient dus aux concentrations en bactériocine utilisées. A faible concentration, la bactériocine nécessiterait la présence d'un récepteur pour concentrer localement les peptides. Au contraire, lorsque la bactériocine est présente en forte concentration, les peptides peuvent interagir et s'adsorber directement sur la membrane cytoplasmique en formant des « patchs » positifs permettant la formation de liaisons électrostatiques avec les têtes polaires des phospholipides. Toutefois, cette hypothèse ne permet pas d'expliquer les deux mécanismes d'action observés avec la mésentéroïne 52A. En effet, les résultats ont été obtenus en utilisant des quantités physiologiques en bactériocines. De plus, les deux mécanismes d'action ne peuvent pas être expliqués par une différence de sensibilité car les deux souches de *Listeria* présentent la même CMI vis-à-vis de la mésentéroïne 52A.

Un récepteur spécifique aux bactériocines de la sous-classe IIa, en particulier la mannose-perméase (Diep *et al.*, 2007), semble impliqué dans leur mécanisme d'action. Le degré d'expression de ce récepteur, ou une mutation dans ce dernier, pourrait, selon la souche étudiée, expliquer en partie ou en totalité les deux types de mécanismes d'action mis en évidence avec ce modèle composé de deux souches de *Listeria*. L'influence de divers glucides, favorisant ou non l'expression de la mannose-perméase, a été étudiée. Les résultats obtenus n'ont pas permis de mettre en évidence des différences entre les deux souches ni même une modification de la sensibilité à la mésentéroïne 52A due aux glucides. Une recherche plus approfondie de l'expression de la mannose-perméase pourrait être effectuée. Des techniques plus directes pourront être utilisées comme la recherche par RT-PCR de l'expression des gènes codant ce transporteur. Cette technique est possible car cette protéine est hautement conservée (98 % minimum) entre les différentes espèces de *Listeria* sp. et les séquences connues.

Il serait intéressant d'étudier par anisotropie de fluorescence le degré de pénétration de la mésentéroïne 52A chez d'autres souches appartenant au genre *Listeria* afin de généraliser les résultats obtenus. La recherche de deux mécanismes d'action différents a été entreprise chez deux autres souches sensibles à la mésentéroïne 52A appartenant au genre *Leuconostoc*. Les résultats préliminaires (non montrés) indiquent que selon la souche, il y a une pénétration en profondeur ou une insertion partielle de la mésentéroïne 52A. Par conséquent, il semble que l'existence de deux types de mécanisme d'action pour cette bactériocine ne se limite pas au genre *Listeria*.

La compréhension des mécanismes d'action des peptides antibactériens peut être abordée *via* l'étude des phénomènes de résistance. Un modèle intéressant a été développé lors d'une précédente thèse (Limonet *et al.*, 2002). Il comportait une souche sensible à la mésentéroïne 52A (*Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* LMA 7), un variant de cette souche devenu résistant à cette bactériocine (*Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* LMA 7AR) et une souche naturellement insensible à ce peptide antibactérien (*Ln. citreum* CIP 103405). Les résultats obtenus grâce à des techniques complémentaires à celles déjà utilisées, comme la mesure de l'affinité pour les solvants organiques, ont permis de montrer que le variant résistant avait un caractère acide-base de Lewis plus proche de celui de la souche naturellement insensible que de celui de la souche parentale. Cette enveloppe chargée positivement chez les deux souches résistantes formerait donc une première barrière contre la bactériocine. Le peptide cationique serait repoussé par l'enveloppe cellulaire grâce à des répulsions électrostatiques. De plus, la mésentéroïne 52A ne s'adsorbe pas sur la membrane des souches résistantes. La composition membranaire suggère que la membrane de ces souches est moins anionique que celle de la souche sensible. Avec une membrane dont le caractère anionique est moins marqué, les interactions avec le peptide cationique pourraient être moins stables. En revanche, chez la souche sensible, la bactériocine s'adsorbe à la surface des cellules et s'insère dans la membrane pour y former des pores provoquant des fuites de potassium et une dissipation du potentiel de membrane.

La composition membranaire de ces trois souches (Limonet *et al.*, 2002) est différente au niveau des phospholipides et au niveau des chaînes d'acides gras. La membrane des deux souches résistantes est, selon ces compositions, plus rigide que celle de la souche sensible. Plusieurs études ont montré des résultats semblables. Cependant, des résultats contradictoires ont été obtenus avec d'autres modèles, dans lesquels la fluidité augmentait en présence de bactériocine. L'hypothèse alors émise est que la souche fluidifie sa membrane pour contrecarrer l'augmentation de la rigidité due à la pénétration du peptide. Il serait donc envisageable d'observer une fluidification en réponse à l'insertion du peptide si la souche est dans un état physiologique permettant de le faire. Dans notre étude, les mesures ont été réalisées sur une durée de deux heures, mais en milieu non prolifératif. Les mesures d'anisotropie de fluorescence sont difficiles à réaliser en conditions prolifératives. Les composants du milieu de culture peuvent interagir avec le système, notamment la sonde fluorescente. De plus, les conditions prolifératives sont sources d'artefacts dans la mesure de l'anisotropie de fluorescence. En effet, la fluidité membranaire des cellules en pleine division varie au cours du cycle cellulaire. Ce cycle dure de une à une heure et demi chez les bactéries

étudiées, ce qui laisse un laps de temps suffisant pour une réponse physiologique comme la fluidification de la membrane. Par conséquent les deux événements pourraient se chevaucher sans être dissociés l'un de l'autre. La division cellulaire entraîne un nombre de cellules plus important, ce qui suggère que la sonde fluorescente ne serait plus en conditions saturantes, rendant la mesure d'anisotropie difficilement interprétable. De plus, la bactériocine serait rapidement titrée, surtout en concentration sub létale. Enfin, un changement de fluidité due à une réponse physiologique implique une modification de la composition au cours du temps, donc un environnement lipidique différent pour la sonde, donc un temps de vie de fluorescence variable. L'anisotropie est corrélée directement à la microviscosité quand le temps de vie de fluorescence est constant. En conditions prolifératives une variable supplémentaire doit être introduite dans la formule, alourdissant alors la modélisation.

Les premiers résultats obtenus sur la caractérisation des enveloppes cellulaires suggèrent que des différences entre les souches étudiées puissent expliquer leur résistance ou leur sensibilité à la mésentéroïne 52A. Par conséquent, une caractérisation plus approfondie de l'enveloppe des souches résistantes et sensibles est envisageable. La mesure de la mobilité électrophorétique en fonction du pH et de la force ionique couplée à une mesure de l'épaisseur de la frange polymérique par microscopie électronique à transmission permettrait de modéliser les caractères de la première barrière physique rencontrée par le peptide antibactérien. Les premiers résultats (non montrés) tendent à montrer une différence de densité et d'accessibilité des charges de la frange polymérique entre les différentes souches de *Leuconostoc* sp. Contrairement à la souche sensible, la souche naturellement insensible présente à sa surface une grande densité de charges négatives accessibles. Cette frange polymérique pourrait donc piéger la mésentéroïne 52A. Avec cette hypothèse, *Ln. citreum* CIP 103405 pourrait être insensible à tous les peptides cationiques. Le variant résistant quant à lui présente un profil intermédiaire. A plus long terme, la surface des différentes bactéries pourrait être étudiée par microscopie de force atomique.

La composition de la paroi, notamment le degré de D-alanylation dans les acides téichoïques et lipotéichoïques serait intéressant à étudier pour vérifier une corrélation déjà observée dans d'autres modèles (Kovacs *et al.*, 2006 ; Kramer *et al.*, 2008).

Le phénotype de résistance aux bactériocines semble donc lié à un ensemble de changements physiologiques mineurs dans l'ensemble de la cellule.

Certains auteurs ont suggéré que l'apparition de résistants est due à une mutation d'un récepteur, la mannose-perméase. Pour vérifier cette hypothèse, une recherche de cette protéine chez les trois souches du modèle semble incontournable. Malheureusement, aucun

génomique de *Leuconostoc* n'est disponible pour le moment. Il serait intéressant de faire synthétiser par expression hétérologue la mannose-perméase reconnue par la bactériocine chez la souche résistante, et d'analyser le phénotype de sensibilité/résistance de cette souche.

La mésentéroïne 52A appartient à la sous-classe IIa et présente deux types de mécanisme d'action. Afin de pouvoir généraliser ces résultats, des travaux doivent être entrepris avec d'autres bactériocines de la sous-classe IIa. Les carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2, naturellement produites par *C. maltaromaticum* CP 5, ont été synthétisées et purifiées à partir de souches recombinantes d'*E. coli*. Les constructions génétiques sont issues de travaux publiés par d'autres équipes (Gibbs *et al.*, 2004 ; Richard *et al.*, 2004a). En revanche, les hauts rendements obtenus s'expliquent par le fait que la phase de production en fermenteur ait été optimisée notamment au moment de l'induction de la production de la protéine d'intérêt.

Les applications de ce protocole de production peuvent être élargies. Lors de l'étape de PCR, il est possible de générer des mutations précises dans la séquence primaire du peptide pour produire des bactériocines mutées souvent utiles pour comprendre les relations structure/fonction. Il est envisageable de produire également des protéines d'immunité. Des quantités importantes de chaque acteur permettraient de vérifier la présence d'interactions entre la bactériocine et sa protéine d'immunité par titration calorimétrique isotherme (ITC) et ainsi déterminer les constantes d'affinité et de dissociation (K_A et K_D) de ces éventuels complexes protéiques.

Les spectres d'activité des carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2 sont les mêmes que ceux décrits dans la littérature et comprennent les genres *Carnobacterium*, *Enterococcus* et *Listeria*. Un effet synergique entre les deux peptides antibactériens a été observé vis-à-vis des souches sensibles aux deux carnobactériocines. La combinaison optimale entre les deux bactériocines, déterminée par la méthode des fractions de concentration inhibitrice (FIC), est toujours plus efficace par rapport aux peptides seuls. La synergie d'action permet d'optimiser l'activité inhibitrice tout en réduisant significativement les quantités nécessaires de chaque bactériocine. Cependant, la présence d'une synergie d'action soulève une question concernant le rôle de la mannose-perméase. Les deux carnobactériocines étant de la même sous-classe, elles doivent probablement reconnaître le même récepteur. Cette hypothèse est contradictoire

avec une synergie d'action. En effet, pour un même récepteur, une inhibition compétitive entre les deux peptides serait attendue. Il est donc possible que la synergie d'action mette en jeu un mécanisme différent de celui décrit pour une bactériocine seule et soit une coopération ordonnée. La première bactériocine se fixerait et modifierait la conformation du récepteur en augmentant son affinité pour la deuxième bactériocine. Pour vérifier cette hypothèse, il serait envisageable de travailler avec des bactériocines tronquées jouant le rôle d'inhibiteur compétitif.

Il est envisageable que *C. maltaromaticum* CP5 produise plusieurs bactériocines afin d'augmenter son efficacité inhibitrice sur les autres souches et ainsi coloniser plus facilement son environnement. La physiologie de production des carnobactériocines chez *C. maltaromaticum* CP5 est mal connue. Il serait intéressant de connaître la physiologie détaillée de cette production pour comprendre les avantages adaptatifs conférés à la souche produisant deux bactériocines, déterminer la phase pendant laquelle la production est maximale, analyser si la production des carnobactériocines est ordonnée ou non et connaître les facteurs physico-chimiques inhibant ou favorisant la synthèse d'une ou des deux carnobactériocines. Les carnobactériocines peuvent être dosées en utilisant des méthodes telles que la RT-PCR après extraction des ARNm ou le Western Blot (Richard *et al.*, 2004b). Pour cette dernière, il serait nécessaire de produire des anticorps. Les deux peptides étant similaires, il est possible que les anticorps anti-Cbn BM1 reconnaissent également la carnobactériocine Cbn B2 et vice-versa. Une méthode alternative consisterait en la construction d'une souche mutante de *C. maltaromaticum* CP5 dans laquelle les gènes codant la carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2 auraient chacun été fusionnés à une séquence codant un peptide antigénique pour lequel des anticorps sont commercialisés. Les carnobactériocines ainsi marquées d'un antigène distinct pourraient être dosées par la méthode ELISA.

En parallèle, l'activité antibactérienne de chaque bactériocine pourrait être dosée *via* la détermination des CMI. Pour ce faire, il faudrait utiliser des souches sensibles à une des deux bactériocines, comme certaines souches du genre *Enterococcus*, sensibles uniquement à la carnobactériocine Cbn B2. Cependant, il serait alors indispensable de vérifier l'absence de synergie ou d'antagonisme entre les deux carnobactériocines vis-à-vis de ce type de souche. Pour augmenter la précision des méthodes de mesure des CMI, les dilutions en cascade peuvent être réalisées en changeant l'incrément des dilutions (passer d'un incrément 2 à 3). Ces modifications permettraient de couvrir une gamme plus large de concentrations avec plus de précision. Ces différents dosages permettraient également de vérifier si la souche optimise

les quantités produites et si ces dernières sont de l'ordre de celles déterminées par la méthode des FIC.

Les deux carnobactériocines appartiennent à la même sous-classe que la mésentéroïcine 52A. Par conséquent, il est envisageable que les carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2 présentent également deux mécanismes d'action différents. Une mesure de l'anisotropie de fluorescence du TMA-DPH et du DPH, en présence des carnobactériocines, ainsi qu'une détermination de leur influence sur la force protomotrice devraient être réalisées sur différentes souches sensibles afin de vérifier cette hypothèse.

Il serait également intéressant d'étudier l'influence des bactériocines sur les fuites d'ATP mais aussi sur le pool intracellulaire de cette molécule et l'état énergétique de la cellule.

L'influence de la bactériocine recombinante divercine V41 sur le taux d'expression de certains gènes chez *E. faecalis* a été étudiée (Calvez *et al.*, 2008). Cette étude a été réalisée par transcription reverse suivie d'une PCR quantitative en présence ou en absence de bactériocine. Il s'avère que certains gènes sont réprimés par la divercine V41 tels que *rpoN* et *glpQ* tandis que d'autres sont surexprimés comme *mptR*, *mptC*, *gap-1* et *pde*. L'expression de certains gènes n'est pas affectée par l'addition de la bactériocine, comme dans le cas de *mptB* et *mptD*. Cette étude a montré que la divercine V41 agissait sur les gènes *mpt* codant la mannose-perméase mais également sur l'expression de gènes codant des enzymes du métabolisme central telles que la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (la GAPDH de la glycolyse) ou du métabolisme des glycérophospholipides comme la glycerophosphodiester phosphodiesterase. Une approche semblable pourrait être utilisée pour connaître l'influence de la mésentéroïcine 52A et des carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2 sur l'expression de gènes codant des enzymes intervenant dans le métabolisme central, particulièrement la glycolyse qui est une voie importante pour la synthèse d'ATP.

L'innocuité des carnobactériocines, seules ou en combinaison, a été déterminée sur des cellules gastro-intestinales de la lignée Caco-2. Ce test a été réalisé avec des doses cent fois supérieures à celles utilisées pour inhiber les bactéries sensibles. Dans aucun cas, une cytotoxicité significative n'a pu être observée. Seule la carnobactériocine Cbn B2 semble la plus active avec 20 % de mortalité. Cependant, les concentrations testées sont très loin de celles produites physiologiquement par la bactérie. De plus, aucune IC₅₀ n'a pu être

déterminée. L'étude de la cytotoxicité des carnobactériocines doit cependant être approfondie, tout particulièrement en utilisant des cellules gastro-intestinales non cancéreuses.

Des applications alimentaires de ces carnobactériocines en tant qu'additif pourraient être envisagées.

Références

bibliographiques

Références bibliographiques

- Abee T., F. M. Rombouts, J. Hugenholtz, G. Guihard and L. Letellier (1994)**, Mode of action of nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott A grown at high and low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**, 1962-1968.
- Abee T. (1995)**, Pore-forming bacteriocins of gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiology Reviews*. **129**, 1, 1-10.
- Abriouel H., J. Sanchez-Gonzalez, M. Maqueda, A. Galvez, E. Valdivia and M. Jose Galvez-Ruiz (2001)**, Monolayer Characteristics of Bacteriocin AS-48, pH Effect and Interactions with Dipalmitoyl Phosphatidic Acid at the Air-Water Interface. *Journal of Colloid and Interface Science*. **233**, 2, 306-312.
- Allison G. E., C. Ahn, M. E. Stiles and T. R. Klaenhammer (1995a)**, Utilization of the leucocin A export system in *Leuconostoc gelidum* for production of a *Lactobacillus* bacteriocin. *FEMS Microbiology Letters*. **131**, 1, 87-93.
- Allison G. E., R. W. Worobo, M. E. Stiles and T. R. Klaenhammer (1995b)**, Heterologous expression of the lactacin F peptides by *Carnobacterium piscicola* LV17. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**, 4, 1371-7.
- Allison G. E. and T. R. Klaenhammer (1996)**, Functional analysis of the gene encoding immunity to lactacin F, lafI, and its use as a *Lactobacillus*-specific, food-grade genetic marker. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**, 12, 4450-60.
- Arihara K., S. Ogihara, T. Mukai, M. Itoh and Y. Kondo (1996)**, Salivacin 140, a novel bacteriocin from *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* T140 active against pathogenic bacteria. *Letters in Applied Microbiology*. **22**, 6, 420-4.
- Arous S., K. Dalet and Y. Hechard (2004)**, Involvement of the mpo operon in resistance to class IIa bacteriocins in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiology Letters*. **238**, 1, 37-41.
- Atrih A. (1994)**, Etude de bactériocines produites par deux souches de *Lactobacillus plantarum*: caractérisation, purification, structure chimique et mode d'action. *Thèse INPL, Nancy, France*.
- Aucher W., V. Simonet, C. Fremaux, K. Dalet, L. Simon, Y. Cenatiempo, J. Frere and J. M. Berjeaud (2004)**, Differences in mesentericin secretion systems from two *Leuconostoc* strains. *FEMS Microbiology Letters*. **232**, 1, 15-22.
- Axelsson L., T. Katla, M. Bjornslett, V. G. Eijsink and A. Holck (1998)**, A system for heterologous expression of bacteriocins in *Lactobacillus sake*. *FEMS Microbiology Letters*. **168**, 1, 137-43.
- Baker R. C., K. Winkowski and T. J. Montville (1996)**, pH-controlled fermentors to increase production of leuconocin S by *Leuconostoc paramesenteroides*. *Process Biochemistry*. **31**, 225-228.
- Barrena-Gonzalez C., E. Huot and H. Petitdemange (1996)**, Mode of action of bacteriocin (J46) produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* J 46. *Journal of Food Protection*. **9**, 955-962.
- Bechinger B. (1999)**, The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1462**, 1-2, 157-83.
- Bellon-Fontaine M. N., J. Rault and C. J. van Oss (1996)**, Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **7**, 1-2, 47-53.
- Bennik M. H., A. Verheul, T. Abee, G. Naaktegeboren-Stoffels, L. G. Gorris and E. J. Smid (1997)**, Interactions of nisin and pediocin PA-1 with closely related lactic acid bacteria that manifest over 100-fold differences in bacteriocin sensitivity. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**, 9, 3628-36.
- Bennik M. H., B. Vanloo, R. Brasseur, L. G. Gorris and E. J. Smid (1998)**, A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated *Enterococcus mundtii*: full characterization and interaction with target organisms. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1373**, 1, 47-58.
- Benoit V., A. Lebrihi, J. B. Millière and G. Lefebvre (1997)**, Purification and partial amino acid sequence of brevicin 27, a bacteriocin produced by *Lactobacillus brevis* SB27. *Current Microbiology*. **34**, 3, 173-9.
- Bhugaloo-Vial P., X. Dousset, A. Metivier, O. Sorokine, P. Anglade, P. Boyaval and D. Marion (1996)**, Purification and amino acid sequences of

piscicocins V1a and V1b, two class IIa bacteriocins secreted by *Carnobacterium piscicola* V1 that display significantly different levels of specific inhibitory activity. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**, 12, 4410-6.

Bhugaloo-Vial P., J. P. Douliez, D. Moll, X. Dousset, P. Boyaval and D. Marion (1999), Delineation of key amino acid side chains and peptide domains for antimicrobial properties of divercin V41, a pediocin-like bacteriocin secreted by *Carnobacterium divergens* V41. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**, 7, 2895-900.

Bhunja A. K., M. C. Johnson and B. Ray (1988), Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Journal of Applied Bacteriology*. **65**, 4, 261-8.

Bhunja A. K., M. C. Johnson, B. Ray and N. Kalchayanand (1991), Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. *Journal of Applied Bacteriology*. **70**, 25-33.

Biet F., J. M. Berjeaud, R. W. Worobo, Y. Cenatiempo and C. Fremaux (1998), Heterologous expression of the bacteriocin mesentericin Y105 using the dedicated transport system and the general secretion pathway. *Microbiology*. **144** (Pt 10), 2845-54.

Blom H., T. Katla, B. F. Hagen and L. Axelsson (1997), A model assay to demonstrate how intrinsic factors affect diffusion of bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology*. **38**, 2-3, 103-9.

Blom H., T. Katla, A. Holck, K. Sletten, L. Axelsson and H. Holo (1999), Characterization, production, and purification of leucocin H, a two-peptide bacteriocin from *Leuconostoc* MF215B. *Current Microbiology*. **39**, 1, 43-8.

Blom H., T. Katla, H. Nissen and H. Holo (2001), Characterization, production, and purification of carnocin H, a bacteriocin produced by *Carnobacterium* 377. *Current Microbiology*. **43**, 4, 227-31.

Bokas D., D. Uy, F. Grattepanche, G. Duportail, E. Guedon, S. Delaunay and J. L. Goergen (2007), Cell envelope fluidity modification for an effective glutamate excretion in *Corynebacterium glutamicum* 2262. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **76**, 4, 773-81.

Bouksaim M., I. Fliss, J. Meghrou, R. Simard and C. Lacroix (1998), Immunodot detection of

nisin Z in milk and whey using enhanced chemiluminescence. *Journal of Applied Microbiology*. **84**, 2, 176-84.

Bouttefroy A. and J. B. Millière (2000), Nisin-curvaticin 13 combinations for avoiding the regrowth of bacteriocin resistant cells of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. *International Journal of Food Microbiology*. **62**, 1-2, 65-75.

Breukink E., C. van Kraaij, R. A. Demel, R. J. Siezen, O. P. Kuipers and B. de Kruijff (1997), The C-terminal region of nisin is responsible for the initial interaction of nisin with the target membrane. *Biochemistry*. **36**, 23, 6968-76.

Breukink E., H. E. van Heusden, P. J. Vollmerhaus, E. Swiezewska, L. Brunner, S. Walker, A. J. Heck and B. de Kruijff (2003), Lipid II is an intrinsic component of the pore induced by nisin in bacterial membranes. *Journal of Biological Chemistry*. **278**, 22, 19898-903.

Brillet A., M. F. Pilet, H. Prevost, M. Cardinal and F. Leroi (2005), Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a bio-preservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*. **104**, 3, 309-24.

Brogden K. A. (2005), Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews. Microbiology*. **3**, 3, 238-50.

Brotz H., M. Josten, I. Wiedemann, U. Schneider, F. Gotz, G. Bierbaum and H. G. Sahl (1998), Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Molecular Microbiology*. **30**, 2, 317-27.

Bruno M. E. C. and T. J. Montville (1993), Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**, 3003-3010.

Buchman G. W., S. Banerjee and J. N. Hansen (1988), Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. *Journal of Biological Chemistry*. **263**, 31, 16260-6.

Budde B. B., T. Hornbaek, T. Jacobsen, V. Barkholt and A. G. Koch (2003), *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments. *International Journal of Food Microbiology*. **83**, 2, 171-84.

- Calvez S., A. Rince, Y. Auffray, H. Prevost and D. Drider (2007)**, Identification of new genes associated with intermediate resistance of *Enterococcus faecalis* to divercin V41, a pediocin-like bacteriocin. *Microbiology*. **153**, Pt 5, 1609-18.
- Calvez S., H. Prevost and D. Drider (2008)**, Relative expression of genes involved in the resistance/sensitivity of *Enterococcus faecalis* JH2-2 to recombinant divercin RV41. *Biotechnology Letters*. **30**, 10, 1795-800.
- Carolissen-Mackay V., G. Arendse and J. W. Hastings (1997)**, Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *International Journal of Food Microbiology*. **34**, 1, 1-16.
- Casaus P., T. Nilsen, L. M. Cintas, I. F. Nes, P. E. Hernandez and H. Holo (1997)**, Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology*. **143** (Pt 7), 2287-94.
- Cascales E., S. K. Buchanan, D. Duche, C. Kleanthous, R. Llobes, K. Postle, M. Riley, S. Slatin and D. Cavard (2007)**, Colicin biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : *MMBR*. **71**, 1, 158-229.
- Castano S., B. Desbat, A. Delfour, J. M. Dumas, A. da Silva and J. Dufourcq (2005)**, Study of structure and orientation of mesentericin Y105, a bacteriocin from Gram-positive *Leuconostoc mesenteroides*, and its Trp-substituted analogues in phospholipid environments. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1668**, 1, 87-98.
- Cerrutti P., M. R. Terebiznik, M. S. de Huergo, R. Jagus and A. M. R. Pilosof (2001)**, Combined effect of water activity and pH on the inhibition of *Escherichia coli* by nisin. *Journal of Food Protection*. **64**, 10, 1510-4.
- Chen T. and T. J. Montville (1995)**, Efflux of ions and ATP depletion induced by pediocin PA-1 are concomitant with cell death in *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Applied Bacteriology*. **79**, 684-690.
- Chen Y., R. D. Ludescher and T. J. Montville (1997a)**, Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**, 12, 4770-7.
- Chen Y., R. Shapira, M. Eisenstein and T. J. Montville (1997b)**, Functional characterization of pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a predicted tertiary structure. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**, 2, 524-31.
- Chen Y., R. D. Ludescher and T. J. Montville (1998)**, Influence of lipid composition on pediocin PA-1 binding to phospholipid vesicles. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**, 9, 3530-2.
- Chihib N.-E., T. Crepin, G. Delattre and J.-L. Tholozan (1999)**, Involvement of cell envelope in nisin resistance of *Pectinatus frisingensis*, a Gram-negative, strictly anaerobic beer-spoilage bacterium naturally sensitive to nisin. *FEMS Microbiology Letters*. **177**, 167-175.
- Chikindas M. L., M. J. Garcia-Garcera, A. J. Driessen, A. M. Ledebøer, J. Nissen-Meyer, I. F. Nes, T. Abee, W. N. Konings and G. Venema (1993)**, Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**, 11, 3577-84.
- Chikindas M. L., J. Novak, A. J. Driessen, W. N. Konings, K. M. Schilling and P. W. Caufield (1995a)**, Mutacin II, a bactericidal antibiotic from *Streptococcus mutans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **39**, 12, 2656-60.
- Chikindas M. L., K. Venema, A. M. Ledebøer, G. Venema and J. Kok (1995b)**, Expression of lactococin A and pediocin PA-1 in heterologous hosts. *Letters in Applied Microbiology*. **21**, 3, 183-9.
- Choi H. J., H. S. Lee, S. Her, D. H. Oh and S. S. Yoon (1999)**, Partial characterization and cloning of leucocin J, a bacteriocin produced by *Leuconostoc* sp. J2 isolated from korean fermented vegetable Kimchi. *Journal of Applied Microbiology*. **86**, 175-181.
- Christ K., I. Wiedemann, U. Bakowsky, H. G. Sahl and G. Bendas (2007)**, The role of lipid II in membrane binding of and pore formation by nisin analyzed by two combined biosensor techniques. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1768**, 3, 694-704.
- Christensen D. P. and R. W. Hutkins (1992)**, Collapse of the proton motive force in *Listeria monocytogenes* caused by a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**, 10, 3312-5.
- Cintas L. M., J. M. Rodriguez, M. F. Fernandez, K. Sletten, I. F. Nes, P. E. Hernandez and H. Holo (1995)**, Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus*

acidilactici with a broad inhibitory spectrum. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**, 7, 2643-8.

Cintas L. M., P. Casaus, L. S. Havarstein, P. E. Hernandez and I. F. Nes (1997), Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**, 11, 4321-30.

Cintas L. M., P. Casaus, H. Holo, P. E. Hernandez, I. F. Nes and L. S. Havarstein (1998), Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *Journal of Bacteriology*. **180**, 8, 1988-94.

Cintas L. M., P. Casaus, C. Herranz, L. S. Havarstein, H. Holo, P. E. Hernandez and I. F. Nes (2000), Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *Journal of Bacteriology*. **182**, 23, 6806-14.

Cocolin L. and K. Rantsiou (2007), Sequencing and expression analysis of sakacin genes in *Lactobacillus curvatus* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **76**, 6, 1403-11.

Cotter P. D., C. Hill and R. P. Ross (2005), Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews. Microbiology*. **3**, 777-788.

Coventry M. J., J. B. Gordon, M. Alexander, M. W. Hickey and J. Wan (1996a), A food-grade process for isolation and partial purification of bacteriocins of lactic acid bacteria that uses diatomite calcium silicate. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**, 5, 1764-9.

Coventry M. J., J. Wan, J. B. Gordon, R. F. Mawson and M. W. Hickey (1996b), Production of brevicin 286 by *Lactobacillus brevis* VB286 and partial characterization. *Journal of Applied Bacteriology*. **80**, 1, 91-8.

Crandall A. D. and T. J. Montville (1998), Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**, 1, 231-7.

Cuozzo S., S. Calvez, H. Prevost and D. Drider (2006), Improvement of enterocin P purification process. *Folia Microbiologica*. **51**, 5, 401-5.

Cutter C. N. and G. R. Siragusa (1995a), Population reductions of Gram-Negative pathogens

following treatments with nisin and chelators under various conditions. *Journal of Food Protection*. **58**, 977-983.

Cutter C. N. and G. R. Siragusa (1995b), Treatments with nisin and chelators to reduce *Salmonella* and *Escherichia coli* on beef. *Journal of Food Protection*. **57**, 1028-1030.

Daba H., S. Pandian, J. F. Gosselin, R. E. Simard, J. Huang and C. Lacroix (1991), Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Applied and Environmental Microbiology*. **57**, 12, 3450-5.

Daeschel M. A., J. M. Guire and H. Al-Makhlafi (1992), Antimicrobial activity of nisin adsorbed to hydrophilic and hydrophobic silicon surfaces. *Journal of Food Protection*. **55**, 731-735.

Dalet K., C. Briand, Y. Cenatiempo and Y. Hechard (2000), The rpoN gene of *Enterococcus faecalis* directs sensitivity to subclass IIa bacteriocins. *Current Microbiology*. **41**, 6, 441-3.

Dalet K., Y. Cenatiempo, P. Cossart and Y. Hechard (2001), A sigma(54)-dependent PTS permease of the mannose family is responsible for sensitivity of *Listeria monocytogenes* to mesentericin Y105. *Microbiology*. **147**, Pt 12, 3263-9.

Davies E. A. and M. R. Adams (1994), Resistance of *Listeria monocytogenes* to the bacteriocin nisin. *International Journal of Food Microbiology*. **21**, 4, 341-7.

Davies E. A., M. B. Falahee and M. R. Adams (1996), Involvement of the cell envelope of *Listeria monocytogenes* in the acquisition of nisin resistance. *Journal of Applied Bacteriology*. **81**, 2, 139-46.

De Vuyst L. and E. J. Vandamme (1992), Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *Journal of General Microbiology*. **138** (Pt 3), 571-8.

De Vuyst L. and F. Leroy (2007), Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. **13**, 4, 194-9.

Demel R. A., T. Peelen, R. J. Siezen, B. De Kruijff and O. P. Kuipers (1996), Nisin Z, mutant nisin Z and lacticin 481 interactions with anionic lipids correlate with antimicrobial activity. A monolayer study. *European Journal of Biochemistry*. **235**, 1-2, 267-74.

- Dielbandhoesing S. K., H. Zhang, L. H. Caro, J. M. van der Vaart, F. M. Klis, C. T. Verrips and S. Brul (1998)**, Specific cell wall proteins confer resistance to nisin upon yeast cells. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**, 10, 4047-52.
- Diep D. B., L. S. Havarstein and I. F. Nes (1996)**, Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *Journal of Bacteriology*. **178**, 15, 4472-83.
- Diep D. B. and I. F. Nes (2002)**, Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Current Drug Targets*. **3**, 2, 107-22.
- Diep D. B., M. Skaugen, Z. Salehian, H. Holo and I. F. Nes (2007)**, Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **104**, 7, 2384-9.
- Dougherty B. A., C. Hill, J. F. Weidman, D. R. Richardson, J. C. Venter and R. P. Ross (1998)**, Sequence and analysis of the 60 kb conjugative, bacteriocin-producing plasmid pMRC01 from *Lactococcus lactis* DPC3147. *Molecular Microbiology*. **29**, 4, 1029-38.
- Drider D., G. Fimland, Y. Hechard, L. M. McMullen and H. Prevost (2006)**, The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*. **70**, 2, 564-82.
- Duffes F., P. Jenoe and P. Boyaval (2000)**, Use of two-dimensional electrophoresis To study differential protein expression in divercin V41-resistant and wild-type strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**, 10, 4318-24.
- Duquesne S., V. Petit, J. Peduzzi and S. Rebuffat (2007)**, Structural and functional diversity of microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. **13**, 4, 200-9.
- Dykes G. A. and J. W. Hastings (1998)**, Fitness costs associated with class IIa bacteriocin resistance in *Listeria monocytogenes* B73. *Letters in Applied Microbiology* **26**, 1, 5-8.
- Eijsink V. G., M. Skeie, P. H. Middelhoven, M. B. Brurberg and I. F. Nes (1998)**, Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**, 9, 3275-81.
- Eijsink V. G., L. Axelsson, D. B. Diep, L. S. Havarstein, H. Holo and I. F. Nes (2002)**, Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **81**, 1-4, 639-54.
- Ennahar S., N. Deschamps and J. Richard (2000a)**, Natural variation in susceptibility of *Listeria* strains to class IIa bacteriocins. *Current Microbiology*. **41**, 1, 1-4.
- Ennahar S., T. Sashihara, K. Sonomoto and A. Ishizaki (2000b)**, Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol Review*. **24**, 1, 85-106.
- Felix J. V., M. A. Papathanasopoulos, A. A. Smith, A. von Holy and J. W. Hastings (1994)**, Characterization of leucocin B-Ta11a: a bacteriocin from *Leuconostoc carnosum* Ta11a isolated from meat. *Current Microbiology*. **29**, 4, 207-12.
- Fimland G., O. R. Blingsmo, K. Sletten, G. Jung, I. F. Nes and J. Nissen-Meyer (1996)**, New biologically active hybrid bacteriocins constructed by combining regions from various pediocin-like bacteriocins: the C-terminal region is important for determining specificity. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**, 9, 3313-8.
- Fimland G., R. Jack, G. Jung, I. F. Nes and J. Nissen-Meyer (1998)**, The bactericidal activity of pediocin PA-1 is specifically inhibited by a 15-mer fragment that spans the bacteriocin from the center toward the C terminus. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**, 12, 5057-60.
- Fimland G., L. Johnsen, L. Axelsson, M. B. Brurberg, I. F. Nes, V. G. Eijsink and J. Nissen-Meyer (2000)**, A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. *Journal of Bacteriology*. **182**, 9, 2643-8.
- Fimland G., V. G. Eijsink and J. Nissen-Meyer (2002a)**, Comparative studies of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins. *Microbiology*. **148**, Pt 11, 3661-70.
- Fimland G., V. G. Eijsink and J. Nissen-Meyer (2002b)**, Mutational analysis of the role of tryptophan residues in an antimicrobial peptide. *Biochemistry*. **41**, 30, 9508-15.
- Fimland G., K. Sletten and J. Nissen-Meyer (2002c)**, The complete amino acid sequence of the pediocin-like antimicrobial peptide leucocin C. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **295**, 4, 826-7.

- Fimland G., L. Johnsen, B. Dalhus and J. Nissen-Meyer (2005)**, Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: Biosynthesis, structure, and mode of action. *Journal of Peptide Science*. **11**, 11, 688-696.
- Fimland G., J. Pirneskoski, J. Kaewsrichan, A. Jutila, P. E. Kristiansen, P. K. Kinnunen and J. Nissen-Meyer (2006)**, Mutational analysis and membrane-interactions of the beta-sheet-like N-terminal domain of the pediocin-like antimicrobial peptide sakacin P. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1764**, 6, 1132-40.
- Fleming H. P., J. L. Etchells and R. N. Costilow (1975)**, Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **30**, 1040-1042.
- Fleury Y., M. A. Dayem, J. J. Montagne, E. Chaboisseau, J. P. Le Caer, P. Nicolas and A. Delfour (1996)**, Covalent structure, synthesis, and structure-function studies of mesentericin Y 105(37), a defensive peptide from gram-positive bacteria *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of Biological Chemistry*. **271**, 24, 14421-9.
- Franz C. M., M. J. van Belkum, R. W. Worobo, J. C. Vederas and M. E. Stiles (2000)**, Characterization of the genetic locus responsible for production and immunity of carnobacteriocin A: the immunity gene confers cross-protection to enterocin B. *Microbiology*. **146** (Pt 3), 621-31.
- Franz C. M., M. J. van Belkum, W. H. Holzapfel, H. Abriouel and A. Galvez (2007)**, Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiology Reviews*. **31**, 3, 293-310.
- Fregeau Gallagher N. L., M. Sailer, W. P. Niemczura, T. T. Nakashima, M. E. Stiles and J. C. Vederas (1997)**, Three-dimensional structure of leucocin A in trifluoroethanol and dodecylphosphocholine micelles: spatial location of residues critical for biological activity in type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biochemistry*. **36**, 49, 15062-72.
- Fremaux C., Y. Hechard and Y. Cenatiempo (1995)**, Mesentericin Y105 gene clusters in *Leuconostoc mesenteroides* Y105. *Microbiology*. **141** (Pt 7), 1637-45.
- Galvin M., C. Hill and R. P. Ross (1999)**, Lactacin 3147 displays activity in buffer against gram-positive bacterial pathogens which appear insensitive in standard plate assays. *Letters in Applied Microbiology* **28**, 5, 355-8.
- Ganzle M. G., S. Weber and W. P. Hammes (1999)**, Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology*. **46**, 3, 207-17.
- Gao F. H., T. Abee and W. N. Konings (1991)**, Mechanism of action of the peptide antibiotic nisin in liposomes and cytochrome c oxidase-containing proteoliposomes. *Applied and Environmental Microbiology*. **57**, 8, 2164-70.
- Garcera M. J., M. G. Elferink, A. J. Driessen and W. N. Konings (1993)**, In vitro pore-forming activity of the lantibiotic nisin. Role of protonmotive force and lipid composition. *European Journal of Biochemistry*. **212**, 2, 417-22.
- Garde S., M. Avila, M. Medina and M. Nunez (2004)**, Fast induction of nisin resistance in *Streptococcus thermophilus* INIA 463 during growth in milk. *International Journal of Food Microbiology*. **96**, 2, 165-72.
- Garver K. I. and P. M. Muriana (1994)**, Purification and partial amino acid sequence of curvaticin FS47, a heat-stable bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* FS47. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**, 6, 2191-5.
- Geisen R., B. Becker and W. H. Holzapfel (1993)**, Bacteriocin production of *Leuconostoc carnosum* LA54A at different combinations of pH and temperature. *Journal of Industrial Microbiology*. **12**, 337-340.
- Gibbs G. M., B. E. Davidson and A. J. Hillier (2004)**, Novel expression system for large-scale production and purification of recombinant class IIa bacteriocins and its application to piscicolidin 126. *Applied and Environmental Microbiology*. **70**, 6, 3292-7.
- Giraffa G., E. Neviani and A. Veneroni (1990)**, Use of conductance to detect bacteriocin activity. *Journal of Food Protection*. **53**, 772-776.
- Gonzalez B., E. Glaasker, E. R. S. Kunji, A. J. M. Driessen, J. E. Suarez and W. N. Konings (1996)**, Bactericidal mode of action of plantaricin C. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**, 2701-2709.
- Gonzalez C. F. and B. S. Kunka (1987)**, Plasmid-Associated Bacteriocin Production and Sucrose Fermentation in *Pediococcus acidilactici*. *Applied and Environmental Microbiology*. **53**, 10, 2534-2538.

- Goulhen F., J. Meghrouh and C. Lacroix (1998)**, Characterization of nisin-resistant variants of *Pediococcus acidilactici* UL5, a producer of pediocin. *Journal of Applied Microbiology*. **85**, 387-397.
- Gravesen A., P. Warthoe, S. Knochel and K. Thirstrup (2000)**, Restriction fragment differential display of pediocin-resistant *Listeria monocytogenes* 412 mutants shows consistent overexpression of a putative beta-glucoside-specific PTS system. *Microbiology*. **146 (Pt 6)**, 1381-9.
- Gravesen A., A. M. Jydegaard Axelsen, J. Mendes da Silva, T. B. Hansen and S. Knochel (2002a)**, Frequency of bacteriocin resistance development and associated fitness costs in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**, 2, 756-64.
- Gravesen A., M. Ramnath, K. B. Rechinger, N. Andersen, L. Jansch, Y. Hechard, J. W. Hastings and S. Knochel (2002b)**, High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology*. **148**, Pt 8, 2361-9.
- Gravesen A., B. Kallipolitis, K. Holmstrom, P. E. Hoiby, M. Ramnath and S. Knochel (2004)**, pbp2229-mediated nisin resistance mechanism in *Listeria monocytogenes* confers cross-protection to class IIa bacteriocins and affects virulence gene expression. *Applied and Environmental Microbiology*. **70**, 3, 1669-79.
- Guinane C. M., P. D. Cotter, C. Hill and R. P. Ross (2006)**, Spontaneous resistance in *Lactococcus lactis* IL1403 to the lantibiotic lactacin 3147. *FEMS Microbiology Letters*. **260**, 1, 77-83.
- Guinane C. M., P. D. Cotter, E. M. Lawton, C. Hill and R. P. Ross (2007)**, Insertional mutagenesis to generate lantibiotic resistance in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. **73**, 14, 4677-80.
- Gursky L. J., N. I. Martin, D. J. Derksen, M. J. van Belkum, K. Kaur, J. C. Vederas, M. E. Stiles and L. M. McMullen (2006)**, Production of piscicolin 126 by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL26 is controlled by temperature and induction peptide concentration. *Archives of Microbiology*. **186**, 4, 317-25.
- Gutierrez J., R. Criado, R. Citti, M. Martin, C. Herranz, I. F. Nes, L. M. Cintas and P. E. Hernandez (2005a)**, 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**, 3, 239-50.
- Gutierrez J., R. Criado, M. Martin, C. Herranz, L. M. Cintas and P. E. Hernandez (2005b)**, Production of enterocin P, an antilisterial pediocin-like bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13, in *Pichia pastoris*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **49**, 7, 3004-8.
- Guyonnet D., C. Fremaux, Y. Cenatiempo and J. M. Berjeaud (2000)**, Method for rapid purification of class IIa bacteriocins and comparison of their activities. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**, 4, 1744-8.
- Hall M. J., R. F. Middleton and D. Westmacott (1983)**, The fractional inhibitory concentration (FIC) index as a measure of synergy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **11**, 5, 427-33.
- Hanlin M. B., N. Kalchayanand, P. Ray and B. Ray (1993)**, Bacteriocins of lactic acid bacteria in combination have greater antibacterial activity. *Journal of Food Protection*. **56**, 252-255.
- Harding C. D. and B. G. Shaw (1990)**, Antimicrobial activity of *Leuconostoc gelidum* against closely related species and *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Applied Bacteriology*. **69**, 5, 648-54.
- Hasper H. E., B. de Kruijff and E. Breukink (2004)**, Assembly and stability of nisin-lipid II pores. *Biochemistry*. **43**, 36, 11567-75.
- Hastings J. W., M. Sailer, K. Johnson, K. L. Roy, J. C. Vederas and M. E. Stiles (1991)**, Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *Journal of Bacteriology*. **173**, 23, 7491-500.
- Haugen H. S., G. Fimland, J. Nissen-Meyer and P. E. Kristiansen (2005)**, Three-dimensional structure in lipid micelles of the pediocin-like antimicrobial peptide curvacin A. *Biochemistry*. **44**, 49, 16149-57.
- Héchard Y., B. Derijard, F. Letellier and Y. Cenatiempo (1992)**, Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of General Microbiology*. **138**, 12, 2725-31.
- Héchard Y., J. M. Berjeaud and Y. Cenatiempo (1999)**, Characterization of the mesB gene and expression of bacteriocins by *Leuconostoc*

mesenteroides Y105. *Current Microbiology*. **39**, 5, 265-9.

Hécharde Y., C. Pelletier, Y. Cenatiempo and J. Frere (2001), Analysis of sigma(54)-dependent genes in *Enterococcus faecalis*: a mannose PTS permease (EII(Man)) is involved in sensitivity to a bacteriocin, mesentericin Y105. *Microbiology*. **147**, Pt 6, 1575-80.

Hécharde Y. and H. G. Sahl (2002), Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie*. **84**, 5-6, 545-57.

Henderson J. T., A. L. Chopko and P. D. van Wassenaar (1992), Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **295**, 1, 5-12.

Herbin S., F. Mathieu, F. Brule, C. Branlant, G. Lefebvre and A. Lebrihi (1997), Characteristics and genetic determinants of bacteriocin activities produced by *Carnobacterium piscicola* CP5 isolated from cheese. *Current Microbiology*. **35**, 6, 319-26.

Herranz C., Y. Chen, H. J. Chung, L. M. Cintas, P. E. Hernandez, T. J. Montville and M. L. Chikindas (2001a), Enterocin P selectively dissipates the membrane potential of *Enterococcus faecium* T136. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**, 4, 1689-92.

Herranz C., L. M. Cintas, P. E. Hernandez, G. N. Moll and A. J. Driessen (2001b), Enterocin P causes potassium ion efflux from *Enterococcus faecium* T136 cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **45**, 3, 901-4.

Holck A., L. Axelsson and U. Schillinger (1996), Divergicin 750, a novel bacteriocin produced by *Carnobacterium divergens* 750. *FEMS Microbiology Letters*. **136**, 2, 163-8.

Holo H., O. Nilssen and I. F. Nes (1991), Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *Journal of Bacteriology*. **173**, 12, 3879-87.

Holo H., Z. Jeknic, M. Daeschel, S. Stevanovic and I. F. Nes (2001), Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics. *Microbiology*. **147**, Pt 3, 643-51.

Horn N., M. I. Martinez, J. M. Martinez, P. E. Hernandez, M. J. Gasson, J. M. Rodriguez and

H. M. Dodd (1998), Production of pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis* using the lactococcin A secretory apparatus. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**, 3, 818-23.

Horn N., M. I. Martinez, J. M. Martinez, P. E. Hernandez, M. J. Gasson, J. M. Rodriguez and H. M. Dodd (1999), Enhanced production of pediocin PA-1 and coproduction of nisin and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**, 10, 4443-50.

Horn N., A. Fernandez, H. M. Dodd, M. J. Gasson and J. M. Rodriguez (2004), Nisin-controlled production of pediocin PA-1 and colicin V in nisin- and non-nisin-producing *Lactococcus lactis* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. **70**, 8, 5030-2.

Houlihan A. J., H. C. Mantovani and J. B. Russell (2004), Effect of pH on the activity of bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5. *FEMS Microbiology Letters*. **231**, 1, 27-32.

Houlihan A. J. and J. B. Russell (2006), The effect of calcium and magnesium on the activity of bovicin HC5 and nisin. *Current Microbiology*. **53**, 5, 365-9.

Hsu S. T., E. Breukink, B. de Kruijff, R. Kaptein, A. M. Bonvin and N. A. van Nuland (2002), Mapping the targeted membrane pore formation mechanism by solution NMR: the nisin Z and lipid II interaction in SDS micelles. *Biochemistry*. **41**, 24, 7670-6.

Hsu S. T., E. Breukink, G. Bierbaum, H. G. Sahl, B. de Kruijff, R. Kaptein, N. A. van Nuland and A. M. Bonvin (2003), NMR study of mersacidin and lipid II interaction in dodecylphosphocholine micelles. Conformational changes are a key to antimicrobial activity. *Journal of Biological Chemistry*. **278**, 15, 13110-7.

Huang H. W. (2006), Molecular mechanism of antimicrobial peptides: the origin of cooperativity. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1758**, 9, 1292-302.

Huot E., C. Barrena-Gonzalez and H. Petitdemange (1996), Comparative effectiveness of nisin and bacteriocin J46 at different pH values. *Letters in Applied Microbiology*. **22**, 1, 76-9.

Ingham A. B., K. W. Sproat, M. L. Tizard and R. J. Moore (2005), A versatile system for the expression of nonmodified bacteriocins in *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*. **98**, 3, 676-83.

- Jack R. W., J. R. Tagg and B. Ray (1995)**, Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews*. **59**, 2, 171-200.
- Jack R. W., J. Wan, J. Gordon, K. Harmark, B. E. Davidson, A. J. Hillier, R. E. Wettenhall, M. W. Hickey and M. J. Coventry (1996)**, Characterization of the chemical and antimicrobial properties of piscicolin 126, a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* JG126. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**, 8, 2897-903.
- Jarvis B. (1967)**, Resistance to nisin and production of nisin-inactivating enzymes by several *Bacillus* species. *Journal of General Microbiology*. **47**, 1, 33-48.
- Jimenez-Diaz R., J. L. Ruiz-Barba, D. P. Cathcart, H. Holo, I. F. Nes, K. H. Sletten and P. J. Warner (1995)**, Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**, 12, 4459-63.
- Joerger M. C. and T. R. Klaenhammer (1986)**, Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *Journal of Bacteriology*. **167**, 2, 439-46.
- Johnsen L., G. Fimland, V. Eijsink and J. Nissen-Meyer (2000)**, Engineering increased stability in the antimicrobial peptide pediocin PA-1. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**, 11, 4798-802.
- Joosten H. M. L. J., M. Nunez, B. Devreese, J. V. Beeumen and J. D. Marugg (1996)**, Purification and characterization of enterocin 4, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* INIA4. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**, 4220-4223.
- Kaiser A. L. and T. J. Montville (1993)**, The influence of pH and growth rate on production of the bacteriocin, bavaricin MN, in batch and continuous fermentations. *Journal of Applied Bacteriology*. **75**, 6, 536-540.
- Kaiser A. L. and T. J. Montville (1996)**, Purification of the bacteriocin bavaricin MN and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipid vesicles. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**, 12, 4529-35.
- Kalchayanand N., M. B. Hanlin and B. Ray (1992)**, Sublethal injury makes Gram-negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocin, pediocin AcH and nisin. *Letters in Applied Microbiology*. **15**, 239-243.
- Kanatani K., M. Oshimura and K. Sano (1995)**, Isolation and characterization of acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**, 3, 1061-7.
- Kawai Y., R. Kemperman, J. Kok and T. Saito (2004)**, The circular bacteriocins gassericin A and circularin A. *Current Protein & Peptide Science*. **5**, 5, 393-8.
- Kemperman R., M. Jonker, A. Nauta, O. P. Kuipers and J. Kok (2003)**, Functional analysis of the gene cluster involved in production of the bacteriocin circularin A by *Clostridium beijerinckii* ATCC 25752. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**, 10, 5839-48.
- Khouiti Z. and J. P. Simon (2004)**, Carnocin KZ213 produced by *Carnobacterium piscicola* 213 is adsorbed onto cells during growth. Its biosynthesis is regulated by temperature, pH and medium composition. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. **31**, 1, 5-10.
- Kim J. F., H. Jeong, J. S. Lee, S. H. Choi, M. Ha, C. G. Hur, J. S. Kim, S. Lee, H. S. Park, Y. H. Park and T. K. Oh (2008)**, Complete genome sequence of *Leuconostoc citreum* KM20. *Journal of Bacteriology*. **190**, 8, 3093-4.
- Klaenhammer T. R. (1988)**, Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*. **70**, 3, 337-49.
- Klaenhammer T. R. (1993)**, Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. **12**, 1-3, 39-85.
- Klocke M., K. Mundt, F. Idler, S. Jung and J. E. Backhausen (2005)**, Heterologous expression of enterocin A, a bacteriocin from *Enterococcus faecium*, fused to a cellulose-binding domain in *Escherichia coli* results in a functional protein with inhibitory activity against *Listeria*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **67**, 4, 532-8.
- Kordel M. and H.-G. Sahl (1986)**, Susceptibility of bacterial, eukaryotic and artificial membranes to the disruptive action of the cationic peptides Pep 5 and nisin. *FEMS Microbiology Letters*. **34**, 139-144.
- Kordel M., R. Benz and H. G. Sahl (1988)**, Mode of action of the staphylococcinlike peptide Pep 5: voltage-dependent depolarization of bacterial and artificial membranes. *Journal of Bacteriology*. **170**, 1, 84-8.

- Kovacs M., A. Halfmann, I. Fedtke, M. Heintz, A. Peschel, W. Vollmer, R. Hakenbeck and R. Bruckner (2006)**, A functional dlt operon, encoding proteins required for incorporation of d-alanine in teichoic acids in gram-positive bacteria, confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*. **188**, 16, 5797-805.
- Kramer N. E., E. J. Smid, J. Kok, B. de Kruijff, O. P. Kuipers and E. Breukink (2004)**, Resistance of Gram-positive bacteria to nisin is not determined by lipid II levels. *FEMS Microbiology Letters*. **239**, 1, 157-61.
- Kramer N. E., S. A. van Hijum, J. Knol, J. Kok and O. P. Kuipers (2006)**, Transcriptome analysis reveals mechanisms by which *Lactococcus lactis* acquires nisin resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **50**, 5, 1753-61.
- Kramer N. E., H. E. Hasper, P. T. van den Bogaard, S. Morath, B. de Kruijff, T. Hartung, E. J. Smid, E. Breukink, J. Kok and O. P. Kuipers (2008)**, Increased D-alanylation of lipoteichoic acid and a thickened septum are main determinants in the nisin resistance mechanism of *Lactococcus lactis*. *Microbiology*. **154**, Pt 6, 1755-62.
- Krier F., A. M. Revol-Junelles and P. Germain (1998)**, Influence of temperature and pH on production of two bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 during batch fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **50**, 3, 359-363.
- Kristiansen P. E., G. Fimland, D. Mantzilas and J. Nissen-Meyer (2005)**, Structure and mode of action of the membrane-permeabilizing antimicrobial peptide pheromone plantaricin A. *Journal of Biological Chemistry*. **280**, 24, 22945-50.
- Krull R. E., P. Chen, J. Novak, M. Kirk, S. Barnes, J. Baker, N. R. Krishna and P. W. Caufield (2000)**, Biochemical structural analysis of the lantibiotic mutacin II. *Journal of Biological Chemistry*. **275**, 21, 15845-50.
- Kuhry J. G., P. Fonteneau, G. Duportail, C. Maechling and G. Laustriat (1983)**, TMA-DPH: a suitable fluorescence polarization probe for specific plasma membrane fluidity studies in intact living cells. *Cell Biophysics*. **5**, 2, 129-40.
- Leer R. J., J. M. van der Vossen, M. van Giezen, J. M. van Noort and P. H. Pouwels (1995)**, Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiology*. **141** (Pt 7), 1629-35.
- Leisner J. J., B. G. Laursen, H. Prevost, D. Drider and P. Dalgaard (2007)**, *Carnobacterium*: positive and negative effects in the environment and in foods. *FEMS Microbiology Reviews*. **31**, 5, 592-613.
- Lentz B. R. and S. W. Burgess (1989)**, A dimerization model for the concentration dependent photophysical properties of diphenylhexatriene and its phospholipid derivatives. DPHpPC and DPHpPA. *Biophysical Journal*. **56**, 4, 723-33.
- Leroy F., K. Lievens and L. De Vuyst (2005)**, Modeling bacteriocin resistance and inactivation of *Listeria innocua* LMG 13568 by *Lactobacillus sakei* CTC 494 under sausage fermentation conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**, 11, 7567-70.
- Lewus C. B., S. Sun and T. J. Montville (1992)**, Production of an Amylase-Sensitive Bacteriocin by an Atypical *Leuconostoc paramesenteroides* Strain. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**, 1, 143-149.
- Li J., M. L. Chikindas, R. D. Ludescher and T. J. Montville (2002)**, Temperature- and surfactant-induced membrane modifications that alter *Listeria monocytogenes* nisin sensitivity by different mechanisms. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**, 12, 5904-10.
- Li J., A. A. Aroutcheva, S. Faro and M. L. Chikindas (2005)**, Mode of action of lactocin 160, a bacteriocin from vaginal *Lactobacillus rhamnosus*. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. **13**, 3, 135-40.
- Limonet M., A. M. Revol-Junelles and J. B. Millière (2002)**, Variations in the membrane fatty acid composition of resistant or susceptible *Leuconostoc* or *Weissella* strains in the presence or absence of Mesenterocin 52A and Mesenterocin 52B produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**, 6, 2910-6.
- Limonet M., C. Cailliez-Grimal, M. Linder, A. M. Revol-Junelles and J. B. Millière (2004a)**, Cell envelope analysis of insensitive, susceptible or resistant strains of *Leuconostoc* and *Weissella* genus to *Leuconostoc mesenteroides* FR 52 bacteriocins. *FEMS Microbiology Letters*. **241**, 1, 49-55.
- Limonet M., A. M. Revol-Junelles, C. Cailliez-Grimal and J. B. Millière (2004b)**, Synergistic

- mode of action of mesenterocins 52A and 52B produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR 52. *Current Microbiology*. **48**, 3, 204-7.
- Liu W. and J. N. Hansen (1990)**, Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. **56**, 8, 2551-8.
- Maftah A., D. Renault, C. Vignoles, Y. Hechard, P. Bressollier, M. H. Ratinaud, Y. Cenatiempo and R. Julien (1993)**, Membrane permeabilization of *Listeria monocytogenes* and mitochondria by the bacteriocin mesentericin Y105. *Journal of Bacteriology*. **175**, 10, 3232-5.
- Maisnier-Patin S. and J. Richard (1996)**, Cell wall changes in nisin-resistant variants of *Listeria innocua* grown in the presence of high nisin concentrations. *FEMS Microbiology Letters*. **140**, 1, 29-35.
- Maqueda M., M. Sanchez-Hidalgo, M. Fernandez, M. Montalban-Lopez, E. Valdivia and M. Martinez-Bueno (2008)**, Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. **32**, 1, 2-22.
- Marciset O., M. C. Jeronimus-Stratingh, B. Mollet and B. Poolman (1997)**, Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin, that functions without a receptor. *Journal of Biological Chemistry*. **272**, 22, 14277-84.
- Martin-Visscher L. A., T. Sprules, L. J. Gursky and J. C. Vederas (2008a)**, Nuclear magnetic resonance solution structure of PisI, a group B immunity protein that provides protection against the type IIa bacteriocin piscicolin 126, PisA. *Biochemistry*. **47**, 24, 6427-36.
- Martin-Visscher L. A., M. J. van Belkum, S. Garneau-Tsodikova, R. M. Whittal, J. Zheng, L. M. McMullen and J. C. Vederas (2008b)**, Isolation and characterization of carnocyclin a, a novel circular bacteriocin produced by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307. *Applied and Environmental Microbiology*. **74**, 15, 4756-63.
- Martin I., J. M. Ruysschaert, D. Sanders and C. J. Giffard (1996)**, Interaction of the lantibiotic nisin with membranes revealed by fluorescence quenching of an introduced tryptophan. *European Journal of Biochemistry*. **239**, 1, 156-64.
- Martinez-Cuesta M. C., C. Pelaez, M. Juarez and T. Requena (1997)**, Autolysis of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* and *Lactobacillus casei* ssp. *casei*. Cell lysis induced by a crude bacteriocin. *International Journal of Food Microbiology*. **38**, 2-3, 125-31.
- Martinez J. M., J. Kok, J. W. Sanders and P. E. Hernandez (2000)**, Heterologous coproduction of enterocin A and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*: detection by specific peptide-directed antibodies. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**, 8, 3543-9.
- Marugg J. D., C. F. Gonzalez, B. S. Kunka, A. M. Ledebuer, M. J. Pucci, M. Y. Toonen, S. A. Walker, L. C. Zoetmulder and P. A. Vandenberg (1992)**, Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, and bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**, 8, 2360-7.
- Mayr-Hasting A., A. J. Hedges and R. C. M. Berkeley (1972)**, Methods for studying bacteriocins. *Methods in Microbiology*. **7A**, 315-422.
- Mazzotta A. S. and T. J. Montville (1997)**, Nisin induces changes in membrane fatty acid composition of *Listeria monocytogenes* nisin-resistant strains at 10 degrees C and 30 degrees C. *Journal of Applied Microbiology*. **82**, 1, 32-8.
- Mazzotta A. S. and T. J. Montville (1999)**, Characterization of fatty acid composition, spore germination, and thermal resistance in a nisin-resistant mutant of *Clostridium botulinum* 169B and in the wild-type strain. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**, 2, 659-64.
- McAuliffe O., R. P. Ross and C. Hill (2001)**, Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews*. **25**, 3, 285-308.
- McCormick J. K., R. W. Worobo and M. E. Stiles (1996)**, Expression of the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 by a signal peptide-dependent general secretory pathway. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**, 11, 4095-9.
- Meghrou J., I. Fliss, M. Bouksaim and C. Lacroix (1999)**, Digoxigenin-labeled probe for rapid identification of nisinogenic *Lactococcus lactis* strains. *FEMS Microbiology Letters*. **171**, 1, 43-8.
- Messens W., J. Verluyten, F. Leroy and L. De Vuyst (2003)**, Modelling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 in response to temperature and pH values used for European sausage fermentation processes.

International Journal of Food Microbiology. **81**, 1, 41-52.

Metivier A., M. F. Pilet, X. Dousset, O. Sorokine, P. Anglade, M. Zagorec, J. C. Piard, D. Marion, Y. Cenatiempo and C. Fremaux (1998), Divercin V41, a new bacteriocin with two disulphide bonds produced by *Carnobacterium divergens* V41: primary structure and genomic organization. *Microbiology*. **144** (Pt 10), 2837-44.

Metivier A., P. Boyaval, F. Duffes, X. Dousset, J. P. Compoint and D. Marion (2000), Triton X-114 phase partitioning for the isolation of a pediocin-like bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *Letters in Applied Microbiology*. **30**, 1, 42-6.

Mierau I. and M. Kleerebezem (2005), 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **68**, 6, 705-17.

Miller K. W., R. Schamber, Y. Chen and B. Ray (1998a), Production of active chimeric pediocin AcH in *Escherichia coli* in the absence of processing and secretion genes from the *Pediococcus pap* operon. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**, 1, 14-20.

Miller K. W., R. Schamber, O. Osmanagaoglu and B. Ray (1998b), Isolation and characterization of pediocin AcH chimeric protein mutants with altered bactericidal activity. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**, 6, 1997-2005.

Ming X. and M. A. Daeschel (1993), Nisin resistance of foodborne bacteria and the specific resistance responses of *Listeria monocytogenes* ScottA. *Journal of Food Protection*. **56**, 11, 944-948.

Ming X. and M. A. Daeschel (1995), Correlation of cellular phospholipid content with nisin resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Food Protection*. **58**, 4, 416-420.

Molenaar D., T. Abee and W. N. Konings (1991), Continuous measurement of the cytoplasmic pH in *Lactococcus lactis* with a fluorescent pH indicator. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1115**, 1, 75-83.

Moll G. N., W. N. Konings and A. J. Driessen (1999a), Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **76**, 1-4, 185-98.

Moll G. N., E. van den Akker, H. H. Hauge, J. Nissen-Meyer, I. F. Nes, W. N. Konings and A. J. Driessen (1999b), Complementary and overlapping selectivity of the two-peptide bacteriocins

plantaricin EF and JK. *Journal of Bacteriology*. **181**, 16, 4848-52.

Montville T. J., H. J. Chung, M. L. Chikindas and Y. Chen (1999), Nisin A depletes intracellular ATP and acts in bactericidal manner against *Mycobacterium smegmatis*. *Letters in Applied Microbiology* **28**, 3, 189-93.

Morency H., M. Mota-Meira, G. LaPointe, C. Lacroix and M. C. Lavoie (2001), Comparison of the activity spectra against pathogens of bacterial strains producing a mutacin or a lantibiotic. *Canadian Journal of Microbiology*. **47**, 4, 322-31.

Morisset D. and J. Frere (2002), Heterologous expression of bacteriocins using the mesentericin Y105 dedicated transport system by *Leuconostoc mesenteroides*. *Biochimie*. **84**, 5-6, 569-576.

Mortvedt C. I., J. Nissen-Meyer, K. Sletten and I. F. Nes (1991), Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. *Applied and Environmental Microbiology*. **57**, 6, 1829-34.

Mugochi T., M. P. Nandakumar, R. Zvauya and B. Mattiasson (2001), Bioassay for the rapid detection of bacteriocins in fermentation broth. *Biotechnology Letters*. **23**, 15, 1243-1247.

Mulet-Powell N., A. M. Lacoste-Armynot, M. Vinas and M. Simeon de Buochberg (1998), Interactions between pairs of bacteriocins from lactic bacteria. *Journal of Food Protection*. **61**, 9, 1210-2.

Muriana P. M. and T. R. Klaenhammer (1991), Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Applied and Environmental Microbiology*. **57**, 1, 114-21.

Naghmouchi K., D. Drider, E. Kheadr, C. Lacroix, H. Prevost and I. Fliiss (2006), Multiple characterizations of *Listeria monocytogenes* sensitive and insensitive variants to divergicin M35, a new pediocin-like bacteriocin. *Journal of Applied Microbiology*. **100**, 1, 29-39.

Naghmouchi K., E. Kheadr, C. Lacroix and I. Fliiss (2007), Class I/Class IIa bacteriocin cross-resistance phenomenon in *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*. **24**, 7-8, 718-27.

Nes I. F., D. B. Diep, L. S. Havarstein, M. B. Brurberg, V. Eijsink and H. Holo (1996), Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **70**, 2-4, 113-28.

- Nes I. F. and H. Holo (2000)**, Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers*. **55**, 1, 50-61.
- Netz D. J., C. Bastos Mdo and H. G. Sahl (2002)**, Mode of action of the antimicrobial peptide aureocin A53 from *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**, 11, 5274-80.
- Nieto Lozano J. C., J. N. Meyer, K. Sletten, C. Pelaz and I. F. Nes (1992)**, Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Journal of General Microbiology*. **138** (Pt 9), 1985-90.
- Nigmatova K., L. Serencova, M. Pikhova, P. Javorsky and P. Pristas (2008)**, Heterologous expression of functionally active enterolysin A, class III bacteriocin from *Enterococcus faecalis*, in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. **60**, 1, 20-4.
- Nilsen T., I. F. Nes and H. Holo (2003)**, Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**, 5, 2975-84.
- Nilsson L., M. K. Nielsen, Y. Ng and L. Gram (2002)**, Role of acetate in production of an autoinducible class IIa bacteriocin in *Carnobacterium piscicola* A9b. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**, 5, 2251-60.
- Nilsson L., T. B. Hansen, P. Garrido, C. Buchrieser, P. Glaser, S. Knochel, L. Gram and A. Gravesen (2005)**, Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by a nonbacteriocinogenic *Carnobacterium piscicola*. *Journal of Applied Microbiology*. **98**, 1, 172-83.
- Nissen-Meyer J., H. Holo, L. S. Havarstein, K. Sletten and I. F. Nes (1992)**, A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *Journal of Bacteriology*. **174**, 17, 5686-92.
- Nunez M., J. Tomillo, P. Gaya and M. Medina (1996)**, Bacteriocin quantification by the critical dilution method : a comparison of arbitrary units with diameter and area of the zone of growth inhibition. *Milchwissenschaft. Milk Science International*. **51**, 7-10.
- O'Keeffe T., C. Hill and R. P. Ross (1999)**, Characterization and heterologous expression of the genes encoding enterocin production, immunity, and regulation in *Enterococcus faecium* DPC1146. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**, 4, 1506-15.
- O'Sullivan L., R. P. Ross and C. Hill (2002)**, Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*. **84**, 5-6, 593-604.
- Pantev A., R. Valcheva, S. Danova, I. Ivanova, I. Minkov, T. Haertle and J. M. Chobert (2003)**, Effect of enterococin A 2000 on biological and synthetic phospholipid membranes. *International Journal of Food Microbiology*. **80**, 2, 145-52.
- Papathanasopoulos M. A., F. Krier, A. M. Revol-Junelles, G. Lefebvre, J. P. Le Caer, A. von Holy and J. W. Hastings (1997)**, Multiple bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* TA33a and other *Leuconostoc/Weissella* strains. *Current Microbiology*. **35**, 6, 331-5.
- Papo N. and Y. Shai (2003)**, Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? *Peptides*. **24**, 11, 1693-703.
- Parente E. and C. Hill (1992)**, A comparison of factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*. **73**, 290-298.
- Parente E., C. Brienza, M. Moles and A. Ricciardi (1995)**, A comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity. *Journal of Microbiological Methods*. **22**, 95-108.
- Parente E., M. Moles and A. Ricciardi (1996)**, Leucocin F10, a bacteriocin from *Leuconostoc carnosum*. *International Journal of Food Microbiology*. **33**, 2-3, 231-43.
- Parente E. and A. Ricciardi (1999)**, Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **52**, 5, 628-38.
- Piard J. C., P. M. Muriana, M. J. Desmazeaud and T. R. Klaenhammer (1992)**, Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**, 279-284.
- Quadri L. E., M. Sailer, K. L. Roy, J. C. Vederas and M. E. Stiles (1994)**, Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. *Journal of Biological Chemistry*. **269**, 16, 12204-11.
- Quadri L. E., L. Z. Yan, M. E. Stiles and J. C. Vederas (1997)**, Effect of amino acid substitutions on the activity of carnobacteriocin B2. Overproduction of the antimicrobial peptide, its

engineered variants, and its precursor in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. **272**, 6, 3384-8.

Rammelsberg M., E. Müller and F. Radler (1990), Caseicin 80 : Purification and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus casei*. *Archives of Microbiology*. **154**, 249-252.

Ramnath M., M. Beukes, K. Tamura and J. W. Hastings (2000), Absence of a putative mannose-specific phosphotransferase system enzyme IIAB component in a leucocin A-resistant strain of *Listeria monocytogenes*, as shown by two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**, 7, 3098-101.

Rasch M. and S. Knochel (1998), Variations in tolerance of *Listeria monocytogenes* to nisin, pediocin PA-1 and bavaricin A. *Letters in Applied Microbiology* **27**, 5, 275-8.

Reckhif N., A. Atrih and G. Lefebvre (1994), Selection and properties of spontaneous mutants of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 resistant to different bacteriocins produced by lactic acid bacteria strains. *Current Microbiology*. **28**, 237-241.

Revol-Junelles A. M. and G. Lefebvre (1996a), Purification and N-terminal amino acid sequence of dextranin 24, a bacteriocin of *Leuconostoc* sp. *Current Microbiology*. **33**, 2, 136-7.

Revol-Junelles A. M., R. Mathis, F. Krier, Y. Fleury, A. Delfour and G. Lefebvre (1996b), *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 synthesizes two distinct bacteriocins. *Letters in Applied Microbiology*. **23**, 2, 120-4.

Richard C., D. Drider, K. Elmorjani, D. Marion and H. Prevost (2004a), Heterologous expression and purification of active divercin V41, a class IIa bacteriocin encoded by a synthetic gene in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **186**, 13, 4276-84.

Richard C., D. Drider, I. Fliss, S. Denery and H. Prevost (2004b), Generation and utilization of polyclonal antibodies to a synthetic C-terminal amino acid fragment of divercin V41, a class IIa bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*. **70**, 1, 248-54.

Richard C., R. Canon, K. Naghmouchi, D. Bertrand, H. Prevost and D. Drider (2006), Evidence on correlation between number of

disulfide bridge and toxicity of class IIa bacteriocins. *Food Microbiology*. **23**, 2, 175-83.

Robichon D., E. Gouin, M. Debarbouille, P. Cossart, Y. Cenatiempo and Y. Hechard (1997), The rpoN (sigma54) gene from *Listeria monocytogenes* is involved in resistance to mesentericin Y105, an antibacterial peptide from *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of Bacteriology*. **179**, 23, 7591-4.

Rodriguez J. M., M. I. Martinez, N. Horn and H. M. Dodd (2003), Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. **80**, 2, 101-16.

Rohde B. H. and L. E. Quadri (2006), Functional characterization of a three-component regulatory system involved in quorum sensing-based regulation of peptide antibiotic production in *Carnobacterium maltaromaticum*. *BMC Microbiology*. **6**, 93.

Ruhr E. and H. G. Sahl (1985), Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **27**, 5, 841-5.

Sahl H. G., M. Kordel and R. Benz (1987), Voltage-dependent depolarization of bacterial membranes and artificial lipid bilayers by the peptide antibiotic nisin. *Archives of Microbiology*. **149**, 2, 120-4.

Sakayori Y., M. Muramatsu, S. Hanada, Y. Kamagata, S. Kawamoto and J. Shima (2003), Characterization of *Enterococcus faecium* mutants resistant to mundticin KS, a class IIa bacteriocin. *Microbiology*. **149**, Pt 10, 2901-8.

Sanchez-Barrena M. J., M. Martinez-Ripoll, A. Galvez, E. Valdivia, M. Maqueda, V. Cruz and A. Albert (2003), Structure of bacteriocin AS-48: from soluble state to membrane bound state. *Journal of Molecular Biology*. **334**, 3, 541-9.

Sanchez J., J. Borrero, B. Gomez-Sala, A. Basanta, C. Herranz, L. M. Cintas and P. E. Hernandez (2008), Cloning and heterologous production of Hiracin JM79, a Sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, in lactic acid bacteria and *Pichia pastoris*. *Applied and Environmental Microbiology*. **74**, 8, 2471-9.

Schillinger U. and F. K. Lucke (1989), Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*. **55**, 8, 1901-6.

- Schillinger U., M. E. Stiles and W. H. Holzapfel (1993), Bacteriocin production by *Carnobacterium piscicola* LV 61. *International Journal of Food Microbiology*. **20**, 3, 131-47.
- Schillinger U., H. S. Chung, K. Keppler and W. H. Holzapfel (1998), Use of bacteriocinogenic lactic acid bacteria to inhibit spontaneous nisin-resistant mutants of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Applied Microbiology*. **85**, 4, 657-63.
- Schuller F., R. Benz and H. G. Sahl (1989), The peptide antibiotic subtilin acts by formation of voltage-dependent multi-state pores in bacterial and artificial membranes. *European Journal of Biochemistry*. **182**, 1, 181-6.
- Schved F., M. D. Pierson and B. J. Juven (1996), Sensitization of *Escherichia coli* to nisin by maltol and ethyl maltol. *Letters in Applied Microbiology* **22**, 3, 189-91.
- Shahani K. M., J. R. Vakil and A. Kilara (1976), Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *bulgaricus*. Cultural conditions for the production of antibiotics. *Cultured dairy products journal of the American Cultured Dairy Products Institute*. 14-17.
- Shai Y. (1999), Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1462**, 1-2, 55-70.
- Simon L., C. Fremaux, Y. Cenatiempo and J. M. Berjeaud (2002), Sakacin g, a new type of antilisterial bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**, 12, 6416-20.
- Soliman W., S. Bhattacharjee and K. Kaur (2007), Molecular dynamics simulation study of interaction between a class IIa bacteriocin and its immunity protein. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1774**, 8, 1002-13.
- Song H. J. and J. Richard (1997), Antilisterial activity of three bacteriocins used at sub minimal inhibitory concentrations and cross-resistance of the survivors. *International Journal of Food Microbiology*. **36**, 155-151.
- Sprules T., K. E. Kawulka, A. C. Gibbs, D. S. Wishart and J. C. Vederas (2004a), NMR solution structure of the precursor for carnobacteriocin B2, an antimicrobial peptide from *Carnobacterium piscicola*. *European Journal of Biochemistry*. **271**, 9, 1748-56.
- Sprules T., K. E. Kawulka and J. C. Vederas (2004b), NMR solution structure of ImB2, a protein conferring immunity to antimicrobial activity of the type IIa bacteriocin, carnobacteriocin B2. *Biochemistry*. **43**, 37, 11740-9.
- Stevens K. A., N. A. Klapes, B. W. Sheldon and T. R. Klaenhammer (1992), Antimicrobial action of nisin against *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide mutants. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**, 5, 1786-8.
- Stoffels G., J. Nissen-Meyer, A. Gudmundsdottir, K. Sletten, H. Holo and I. F. Nes (1992), Purification and characterization of a new bacteriocin isolated from a *Carnobacterium* sp. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**, 5, 1417-22.
- Stoffels G., H. G. Sahl and A. Gudmundsdottir (1993), Carnocin UI49, a potential biopreservative produced by *Carnobacterium piscicola*: large scale purification and activity against various gram-positive bacteria including *Listeria* sp. *International Journal of Food Microbiology*. **20**, 4, 199-210.
- Suzuki M., T. Yamamoto, Y. Kawai, N. Inoue and K. Yamazaki (2005), Mode of action of piscicocin CS526 produced by *Carnobacterium piscicola* CS526. *Journal of Applied Microbiology*. **98**, 5, 1146-51.
- Tagg J. R., A. S. Dajani and L. W. Wannamaker (1976), Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriological Reviews*. **40**, 3, 722-56.
- Tahara T., M. Oshimura, C. Umezawa and K. Kanatani (1996), Isolation, partial characterization, and mode of action of Acidocin J1132, a two-component bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**, 3, 892-7.
- Tahiri I., M. Desbiens, R. Bénéch, E. Kheadr, C. Lacroix, S. Thibault, D. Ouellet and I. Fliss (2004), Purification, characterization and amino acid sequencing of divergicin M35: a novel class IIa bacteriocin produced by *Carnobacterium divergens* M35. *International Journal of Food Microbiology*. **97**, 2, 123-36.
- Tichaczek P. S., J. Nissen-Meyer, I. F. Nes, R. F. Vogel and W. P. Hammes (1992), Characterization of the bacteriocin curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin P from *Lb. sake* LTH673. *Systematic and Applied Microbiology*. **15**, 460-468.
- Tichaczek P. S., R. F. Vogel and W. P. Hammes (1994), Cloning and sequencing of sakP encoding

- sakacin P, the bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* LTH 673. *Microbiology*. **140** (Pt 2), 361-7.
- Todorov S. D. and L. M. Dicks (2004)**, Characterization of mesentericin ST99, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* ST99 isolated from boza. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. **31**, 7, 323-9.
- Todorov S. D. and L. M. Dicks (2005)**, Optimization of bacteriocin ST311LD production by *Enterococcus faecium* ST311LD, isolated from spoiled black olives. *Journal of Microbiology*. **43**, 4, 370-4.
- Tomita H., S. Fujimoto, K. Tanimoto and Y. Ike (1996)**, Cloning and genetic organization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pY117. *Journal of Bacteriology*. **178**, 12, 3585-93.
- Twomey D., R. P. Ross, M. Ryan, B. Meaney and C. Hill (2002)**, Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **82**, 1-4, 165-85.
- Uteng M., H. H. Hauge, P. R. Markwick, G. Fimland, D. Mantzilas, J. Nissen-Meyer and C. Muhle-Goll (2003)**, Three-dimensional structure in lipid micelles of the pediocin-like antimicrobial peptide sakacin P and a sakacin P variant that is structurally stabilized by an inserted C-terminal disulfide bridge. *Biochemistry*. **42**, 39, 11417-26.
- Vadyvaloo V., J. W. Hastings, M. J. van der Merwe and M. Rautenbach (2002)**, Membranes of class IIa bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* cells contain increased levels of desaturated and short-acyl-chain phosphatidylglycerols. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**, 11, 5223-30.
- Vadyvaloo V., S. Arous, A. Gravesen, Y. Hechard, R. Chauhan-Haubrock, J. W. Hastings and M. Rautenbach (2004a)**, Cell-surface alterations in class IIa bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* strains. *Microbiology*. **150**, Pt 9, 3025-33.
- Vadyvaloo V., J. L. Snoep, J. W. Hastings and M. Rautenbach (2004b)**, Physiological implications of class IIa bacteriocin resistance in *Listeria monocytogenes* strains. *Microbiology*. **150**, Pt 2, 335-40.
- van Belkum M. J., R. W. Worobo and M. E. Stiles (1997)**, Double-glycine-type leader peptides direct secretion of bacteriocins by ABC transporters: colicin V secretion in *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology*. **23**, 6, 1293-301.
- van Belkum M. J., D. J. Derksen, C. M. Franz and J. C. Vederas (2007)**, Structure function relationship of inducer peptide pheromones involved in bacteriocin production in *Carnobacterium maltaromaticum* and *Enterococcus faecium*. *Microbiology*. **153**, Pt 11, 3660-6.
- Van Den Hooven H. W., C. C. Doeland, M. Van De Kamp, R. N. Konings, C. W. Hilbers and F. J. Van De Ven (1996)**, Three-dimensional structure of the lantibiotic nisin in the presence of membrane-mimetic micelles of dodecylphosphocholine and of sodium dodecylsulphate. *European Journal of Biochemistry*. **235**, 1-2, 382-93.
- van Heusden H. E., B. de Kruijff and E. Breukink (2002)**, Lipid II induces a transmembrane orientation of the pore-forming peptide lantibiotic nisin. *Biochemistry*. **41**, 40, 12171-8.
- van Kraaij C., E. Breukink, M. A. Noordermeer, R. A. Demel, R. J. Siezen, O. P. Kuipers and B. de Kruijff (1998)**, Pore formation by nisin involves translocation of its C-terminal part across the membrane. *Biochemistry*. **37**, 46, 16033-40.
- Van Laack R. L. J. M., U. Shillinger and W. H. Holzapfel (1992)**, Characterization and partial purification of a bacteriocin produced by *Leuconostoc carnosum* LA44A. *International Journal of Food Microbiology*. **16**, 183-195.
- Van Reenen C. A., M. L. Chikindas, W. H. Van Zyl and L. M. Dicks (2003)**, Characterization and heterologous expression of a class IIa bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*. **81**, 1, 29-40.
- van Schaik W., C. G. Gahan and C. Hill (1999)**, Acid-adapted *Listeria monocytogenes* displays enhanced tolerance against the lantibiotics nisin and lactacin 3147. *Journal of Food Protection*. **62**, 5, 536-9.
- Venema K., T. Abee, A. J. Haandrikman, K. J. Leenhouts, J. Kok, W. N. Konings and G. Venema (1993)**, Mode of Action of Lactococcin B, a Thiol-Activated Bacteriocin from *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**, 4, 1041-1048.
- Venema K., R. E. Haverkort, T. Abee, A. J. Haandrikman, K. J. Leenhouts, L. de Leij, G.**

- Venema and J. Kok (1994)**, Mode of action of LciA, the lactococcin A immunity protein. *Molecular Microbiology*. **14**, 3, 521-32.
- Venema K., M. H. Dost, G. Venema and J. Kok (1996)**, Mutational analysis and chemical modification of Cys24 of lactococcin B, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis*. *Microbiology*. **142** (Pt 10), 2825-30.
- Verheul A., N. J. Russell, T. H. R. Van, F. M. Rombouts and T. Abee (1997)**, Modifications of membrane phospholipid composition in nisin-resistant *Listeria monocytogenes* Scott A. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**, 9, 3451-7.
- Vignolo G., J. Palacios, M. E. Farias, F. Sesma, U. Schillinger, W. Holzappel and G. Oliver (2000)**, Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria* species in broth and meat system. *Current Microbiology*. **41**, 6, 410-6.
- Vignolo G. M., M. N. d. Kairuz, A. A. P. d. R. Kolgado and G. Olivier (1995)**, Influence of growth conditions on the production of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. *Journal of Applied Bacteriology*. **78**, 5-10.
- Waite B. L. and R. W. Hutkins (1998a)**, Bacteriocins inhibit glucose PEP:PTS activity in *Listeria monocytogenes* by induced efflux of intracellular metabolites. *Journal of Applied Microbiology*. **85**, 2, 287-92.
- Waite B. L., G. R. Siragusa and R. W. Hutkins (1998b)**, Bacteriocin inhibition of two glucose transport systems in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*. **84**, 5, 715-21.
- Wan J., J. Gordon, M. W. Hickey, R. F. Mawson and M. J. Coventry (1996)**, Adsorption of bacteriocins by ingestible silica compounds. *Journal of Applied Bacteriology*. **81**, 2, 167-73.
- Wan J., K. Harmark, B. E. Davidson, A. J. Hillier, J. B. Gordon, A. Wilcock, M. W. Hickey and M. J. Coventry (1997)**, Inhibition of *Listeria monocytogenes* by piscicolin 126 in milk and Camembert cheese manufactured with a thermophilic starter. *Journal of Applied Microbiology*. **82**, 3, 273-80.
- Wandersman C. (1998)**, Protein and peptide secretion by ABC exporters. *Research in Microbiology*. **149**, 3, 163-70.
- Wang Y., M. E. Henz, N. L. Gallagher, S. Chai, A. C. Gibbs, L. Z. Yan, M. E. Stiles, D. S. Wishart and J. C. Vederas (1999)**, Solution structure of carnobacteriocin B2 and implications for structure-activity relationships among type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biochemistry*. **38**, 47, 15438-47.
- Watson R. M., R. W. Woody, R. V. Lewis, D. S. Bohle, A. H. Andreotti, B. Ray and K. W. Miller (2001)**, Conformational changes in pediocin AcH upon vesicle binding and approximation of the membrane-bound structure in detergent micelles. *Biochemistry*. **40**, 46, 14037-46.
- Weil H. P., A. G. Beck-Sickinger, J. Metzger, S. Stevanovic, G. Jung, M. Josten and H. G. Sahl (1990)**, Biosynthesis of the lantibiotic Pep5. Isolation and characterization of a prepeptide containing dehydroamino acids. *European Journal of Biochemistry* **194**, 1, 217-23.
- Wiedemann I., E. Breukink, C. van Kraaij, O. P. Kuipers, G. Bierbaum, B. de Kruijff and H. G. Sahl (2001)**, Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *Journal of Biological Chemistry*. **276**, 3, 1772-9.
- Wiedemann I., R. Benz and H. G. Sahl (2004)**, Lipid II-mediated pore formation by the peptide antibiotic nisin: a black lipid membrane study. *Journal of Bacteriology*. **186**, 10, 3259-61.
- Winkowski K., M. E. Bruno and T. J. Montville (1994)**, Correlation of bioenergetic parameters with cell death in *Listeria monocytogenes* cells exposed to nisin. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**, 11, 4186-8.
- Winkowski K., R. D. Ludescher and T. J. Montville (1996)**, Physicochemical characterization of the nisin-membrane interaction with liposomes derived from *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**, 2, 323-7.
- Woodruff W. A., J. Novak and P. W. Caufield (1998)**, Sequence analysis of mutA and mutM genes involved in the biosynthesis of the lantibiotic mutacin II in *Streptococcus mutans*. *Gene*. **206**, 1, 37-43.
- Worobo R. W., T. Henkel, M. Sailer, K. L. Roy, J. C. Vederas and M. E. Stiles (1994)**, Characteristics and genetic determinant of a hydrophobic peptide bacteriocin, carnobacteriocin A, produced by *Carnobacterium piscicola* LV17A. *Microbiology*. **140** (Pt 3), 517-26.
- Worobo R. W., M. J. Van Belkum, M. Sailer, K. L. Roy, J. C. Vederas and M. E. Stiles (1995)**, A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from

Carnobacterium divergens. *Journal of Bacteriology*. **177**, 11, 3143-9.

Xie K. and R. E. Dalbey (2008), Inserting proteins into the bacterial cytoplasmic membrane using the Sec and YidC translocases. *Nature Reviews. Microbiology*. **6**, 3, 234-44.

Xue J., I. Hunter, T. Steinmetz, A. Peters, B. Ray and K. W. Miller (2005), Novel activator of mannose-specific phosphotransferase system permease expression in *Listeria innocua*, identified by screening for pediocin AcH resistance. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**, 3, 1283-90.

Yamazaki K., M. Suzuki, Y. Kawai, N. Inoue and T. J. Montville (2005), Purification and characterization of a novel class IIa bacteriocin, piscicocin CS526, from surimi-associated *Carnobacterium piscicola* CS526. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**, 1, 554-7.

Yan L. Z., A. C. Gibbs, M. E. Stiles, D. S. Wishart and J. C. Vederas (2000), Analogues of bacteriocins: antimicrobial specificity and interactions of leucocin A with its enantiomer, carnobacteriocin B2, and truncated derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*. **43**, 24, 4579-81.

Yang R., M. C. Johnson and B. Ray (1992), Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**, 10, 3355-9.

Yildirim S., D. Konrad, S. Calvez, D. Drider, H. Prevost and C. Lacroix (2007), Production of recombinant bacteriocin divercin V41 by high cell density *Escherichia coli* batch and fed-batch cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **77**, 3, 525-31.

Yildirim Z., D. K. Winters and M. G. Johnson (1999), Purification, amino acid sequence and mode of action of bifidocin B produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *Journal of Applied Microbiology*. **86**, 1, 45-54.

Yuzenkova J., M. Delgado, S. Nechaev, D. Savalia, V. Epshtein, I. Artsimovitch, R. A. Mooney, R. Landick, R. N. Farias, R. Salomon and K. Severinov (2002), Mutations of bacterial RNA polymerase leading to resistance to microcin J25. *Journal of Biological Chemistry*. **277**, 52, 50867-75.

Zajdel J. K., P. Ceglowski and W. T. Dobrzanski (1985), Mechanism of action of lactostrepcin 5, a bacteriocin produced by *Streptococcus cremoris* 202. *Applied and Environmental Microbiology*. **49**, 4, 969-74.

Zhao H., R. Sood, A. Jutila, S. Bose, G. Fimland, J. Nissen-Meyer and P. K. Kinnunen (2006), Interaction of the antimicrobial peptide pheromone Plantaricin A with model membranes: implications for a novel mechanism of action. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1758**, 9, 1461-74.

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur Frédéric LEROY, Professeur, IMDO, Vrije Universiteit Brussel, Belgium

Monsieur Hervé PRÉVOST, Professeur, ENITIAA, Nantes

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur JASNIEWSKI Jordane

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

"Etude des mécanismes d'action de bactériocines de la sous-classe IIa"

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Procédés biotechnologiques et alimentaires** »

Fait à Vandoeuvre, le 20 novembre 2008

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT



NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDŒUVRE CEDEX

Etude des mécanismes d'action de bactériocines de la sous-classe IIa

Résumé :

Le site d'action des bactériocines de la sous-classe IIa est la membrane cytoplasmique des bactéries à Gram positif. Le mécanisme d'action se décompose en trois étapes : (i) adsorption de la bactériocine sur la membrane ; (ii) structuration du peptide et insertion dans la bicouche lipidique ; (iii) formation de pores. La présence de pores provoque des fuites de composés vitaux aboutissant soit à un arrêt de la croissance soit à la mort de la bactérie. Le degré de pénétration de la mésentéroïne 52A dans la membrane a été mesuré grâce à l'anisotropie de fluorescence de deux sondes, le TMA-DPH et le DPH, respectivement localisées à la surface et en profondeur de la bicouche lipidique. Des résultats différents ont été obtenus avec deux espèces bactériennes appartenant au genre *Listeria*. Dans un cas, le peptide s'insère partiellement dans la membrane et dans l'autre en profondeur. Ces résultats suggèrent que la mésentéroïne 52A peut suivre deux mécanismes distincts aboutissant à une bactériostase. Pour mieux comprendre les interactions entre la bactériocine et la cellule cible, le degré de pénétration de la mésentéroïne 52A dans la membrane de trois souches de *Leuconostoc*, la première sensible, la seconde naturellement insensible et la dernière rendue résistante, a été caractérisé. Il semblerait que le phénotype de résistance soit corrélé avec les propriétés physico-chimiques de l'enveloppe cellulaire. Afin de pouvoir généraliser les résultats observés avec la mésentéroïne 52A, d'autres bactériocines de la sous-classe IIa, les carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2, produites par la souche *Carnobacterium maltaromaticum* CP5, ont été étudiées. Dans un premier temps, ces bactériocines ont été produites et purifiées à partir d'une souche d'*Escherichia coli* recombinante. L'étape de production en fermenteur a été optimisée, des quantités de l'ordre de 300 mg de peptides ont été produites. Le mode d'action des carnobactériocines, seules ou en combinaison, a été déterminé vis-à-vis de cellules procaryotes ou eucaryotes. Les carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2 ont un mode d'action synergique contre les bactéries sensibles et ne présentent pas de cytotoxicité vis-à-vis des cellules de la lignée Caco-2.

Mots clés : *Listeria*, *Leuconostoc*, peptides antibactériens, mésentéroïne 52A, carnobactériocine BM1, carnobactériocine B2, anisotropie de fluorescence, expression hétérologue, mécanisme d'action.

Study of the mechanisms of action of sub-class IIa bacteriocins

Abstract :

The action site of sub-class IIa bacteriocins is the cytoplasmic membrane of Gram-positive bacteria. The current view of the mechanism of action is divided into three steps: (i) adsorption of bacteriocins on the membrane; (ii) apparition of the structures of peptide and integration into the lipid double layer (iii) formation of pores. The presence of pores leads to efflux of vital cell compounds. They cause growth stop or bacterial death. The degree of penetration of mesenterocin 52A into the membrane was measured by fluorescence anisotropy of two probes, TMA-DPH and the DPH, which target the surface or the depth of the membrane, respectively. Different results were obtained with two bacterial species of the genus *Listeria*. In the first hand, the peptide is partially inserted into the membrane and in the second hand in depth. These results suggest that mesenterocin 52A can exhibit two different mechanisms leading to the same antibacterial effect. To better understand the interactions between bacteriocins and the target cell, the degree of penetration of mesenterocin 52A into the membrane of three *Leuconostoc* strains, the first sensitive, the second naturally resistant and last induced resistant, was characterized. It seems that the resistance phenotype is correlated with physical and chemical properties of the cell envelope. To generalize the results observed with mesenterocin 52A, other bacteriocins of sub-class IIa, the carnobacteriocins Cbn BM1 and Cbn B2, produced by *Carnobacterium maltaromaticum* CP5 strain, were studied. These bacteriocins were produced in *E. coli* and subsequently purified. The optimization of the production process in a reactor led to purify up to 300 mg of peptides for 1.5 liter of culture. The mode of action of carnobacteriocins, alone or in combination, was determined with prokaryotic or eukaryotic cells as targets. The carnobacteriocins Cbn BM1 and Cbn B2 have a synergistic mode of action against sensitive bacteria and are not cytotoxic against Caco-2 cell line.

Keywords : *Listeria*, *Leuconostoc*, antimicrobial peptides, mesenterocin 52A, carnobacteriocin BM1, carnobacteriocin B2, fluorescence anisotropy, heterologous expression, mechanism of action.