

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE MOULOU D MAMMERI DE TIZI OUZOU  
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES  
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE-MICROBIOLOGIE



## MEMOIRE DE MAGISTER

**Spécialité: Sciences Biologiques**  
**Option: Biochimie appliquée aux bio-industries**

Présenté par :

**Mr CHERGUI Achour**

SUJET :

# **Caractérisation de bactériocines anti-*listeria* produites par des souches lactiques isolées à partir du lait de chamelle**

**Devant le jury :**

**Président :** Mr. MATI ABDERRAHMANE. Professeur à l'UMMTO.

**Rapporteur :** Mr. HOUALI KARIM. Maitre de conférences A à l'UMMTO.

**Examineurs :** Mr. DJENANE DJAMAL. Professeur à l'UMMTO.

Mr. RIBA AMAR. Maitre de conférences A à l'UMBB.

Mr. OUELHADJ AKLI. Maitre de conférences B à l'UMMTO.

Année universitaire : 2013 / 2014

# ***REMERCIEMENTS***

Au terme de ce travail, je remercie avant tout, le bon dieu, créateur de toutes les créatures, mobiles soient elles ou immobiles. Je le remercie pour son œuvre et pour ce qu'il a fait de moi: Mon dieu nous ne savons rien sauf ce que tu nous as fait savoir, tu es le savant, tu es le sage.

Mes remerciements les plus distingués pour mon promoteur, le Docteur HOUALI Karim, maître de conférences à l'université Mouloud MAMMARI de Tizi-Ouzou, pour ce qu'il a transmis pour moi comme savoir et comme caractères de bonne personnalité. Qu'il trouve ici, les sentiments de mon profond respect.

Merci pour Mr MATI. A, mon professeur, d'avoir accepté de présider le jury qui a évalué ce travail, d'autre part, je le remercie chaleureusement d'avoir été celui qui m'a formé durant mon cursus.

Je remercie Mr Djennane. D, mon professeur, d'être aussi un membre du jury et l'un de mes formateurs.

Merci pour Mr OUELHADJ. A et Mr RIB. A, d'avoir accepté d'être membres du jury pour évaluer ce travail, pour l'enrichir par leurs remarques et ainsi valoriser, son contenu scientifique et sa présentation.

Je remercie Mme Iratni Ghenima et Mlle Meguenni Nassima, maitres assistantes à l'université Mouloud MAMMARI de Tizi-Ouzou, pour leurs soutiens moral et matériel, pour leurs instructions et leur esprit d'équipe.

Je remercie Monsieur BARIZ Karim, maître assistant à l'université Mouloud MAMMARI de Tizi-Ouzou, pour son aide lors de l'entretien des souches bactériennes et pour ses astuces pratiques, les plus performantes.

Je remercie tous les membres du laboratoire LABAB: Mr SEBBANE. H, Mme SEBBANE ALMI. D, Mme BEDOUHANE, Mme SENANI. N, Mme SENOUCI. C, Mme SI AHMED. S ainsi que les deux ingénieurs: Samia et Hassina, pour leur aide et leur disponibilité.

Je remercie Mlle SALMI Djouza pour sa compréhension et ses services, et pour tout cet esprit d'équipe durant les manipulations et aussi pour son esprit de critique qui nous a permis d'avancer plus loin. Je remercie aussi Mlle ISSELNANE Souad pour son aide.

Je tiens à remercier chaleureusement, mon professeur et mon voisin, Mr ALILI Nacer, enseignant à la faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques, pour son aide colossale et son soutien moral, qu'il trouve ici les sentiments de mon profond respect.

Mes remerciements particuliers pour mon frère Sofiane pour son aide matériel, car c'est grâce à lui que j'ai pu visualiser mes résultats, je le remercie aussi pour sa compréhension.

## *DEDICACES*

Je dédie ce travail,

A mes parents, M<sup>nd</sup> Ouramdane CHERGUI et Djamilia ABDICHE, qui m'ont offert leur éducation, armée de croyance, de patience, de volonté et surtout de simplicité.

A mon frère Nourdine,

A mon promoteur, Monsieur HOUALI Karim, maitre de conférences et vice doyen à l'université Mouloud MAMMARI de Tizi-Ouzou, que je respecte beaucoup et que je vois un pilier essentiel pour la science. A lui le total mérite du fruit de ce travail, car, si j'ai aboutit à ça aujourd'hui, c'est bien grâce à un encadrement parfait et des sacrifices non négligeables par cette personne.

A mes chers amis, Ammar BELKESSAM et Djamel BENNOUAR, qui ont été, et le sont toujours, des frères à moi, dans toutes les situations.

A la sage Samira, qui est pour moi le meilleur guide du respect et de la compréhension, la vraie image de l'éducation et tout simplement, la femme idéale.

A mon oncle Aziz et sa femme Amina, qui m'ont fourni leur aide pendant tout ce long chemin de mes travaux.

Exceptionnellement à ma sœur adorable Lydia, notre petite étoile naissante.

## **RESUME**

Les bactériocines sont des molécules antimicrobiennes de nature peptidique, de poids moléculaire généralement inférieur à 10 KDa. Elles sont produites par des bactéries et actives contre des souches phyllogénétiquement proches.

Nous avons testé le pouvoir bactériocinogène de souches isolées du lait camelin par la méthode de diffusion des puits, suivi du test d'inactivation aux protéases (GONZALEZ *et al*, 2007). Les souches ayant donné les meilleures zones d'inhibition ont été sélectionnées, il s'agit des souches : *Lactococcus lactis ssp lactis CH05*, *Lactococcus lactis ssp raffinolactis CH07*, *Lactococcus lactis ssp lactis CH08* et *Lactobacillus brevis/buchnerii*.

Les peptides antibactériens sont extraits par la méthode d'adsorption/désorption de YANG (1992), puis séparés par une PAGE-SDS et leur activité est détectée par la technique du zymogramme (NISSEN-MEYER *et al*, 1992).

Nous avons d'autre part, réalisé une caractérisation génétique de ces molécules. Pour se faire, les deux souches de *CH05* et *CH07* sont choisies. Nous avons procédé par la méthode de cure des plasmides en utilisant deux antibiotiques, la rifampicine et la novobiocine, comme agents curant. Les mutants *Bac-* obtenus ont subi les tests d'activité par la méthode de diffusion des puits ainsi que par la technique du zymogramme, en utilisant comme témoin positif, les souches sauvages *Bac+*.

Les 4 souches ont donné des zones d'inhibition à l'égard de la souche cible *Listeria innocua F*, par le test de diffusion des puits avec des diamètres de 14mm, 13mm, 08mm et 16mm, pour les souches CH05, CH07, CH08 et CH15 respectivement. Ainsi que par la technique du zymogramme avec des zones d'inhibition situées entre 5 et 10KDa. Les bactériocines produites par les trois souches de *lactococcus* sont sensibles aux protéases utilisées, tandis que celles produites par le lactobacille y résistent.

La disparition des zones d'inhibition après la cure des plasmides, confirme l'emplacement plasmidique des clusters génétiques des bactériocines produites par les souches de *Lactococcus*. D'autre part, l'apparition de la sensibilité des mêmes souches à leurs bactériocines, après la cure plasmidique, indique que les gènes d'immunité sont également plasmidiques. Enfin, notre travail s'achève avec la détermination des CMI des extraits bactériociniques des deux souches modèles. Les valeurs trouvées sont respectivement : 14,28 UA/ml et 7,14UA/ml.

**Mots-clés :** lait de chamelle, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, bactériocines, zymogramme, cure plasmidique, *Listeria*.

## SUMMARY

The bacteriocins are of the antimicrobial molecules of peptide nature, of molecular weight generally lower than 10 KDa. They are produced by bacteria and active against stocks phylogenetically close.

We tested the capacity bacteriocinogene of stocks isolated from milk cameline by the method of diffusion of the wells, follow-up of the test of inactivation to proteases (GONZALEZ *et al.*, 2007). The stocks having given the best zones of inhibition were selected, it acts of the stocks: *Lactococcus lactis ssp lactis* CH05, *Lactococcus lactis ssp raffinolactis* CH07, *Lactococcus lactis ssp lactis* CH08 and *Lactobacillus brevis/buchnerii*.

Antibacterial peptides are extracted by the method of adsorption/desorption of YANG (1992), then separated by a SDS-PAGE and their activity is detected by the zymogramme method (Nissen-meyer *et al.*, 1992).

We in addition, carried out a genetic characterization of these molecules. To be done, the two stocks of CH05 and CH07 are selected. We proceeded by the method of cure of the plasmids by using two antibiotics, the rifampicine and novobiocin, like agents cleaning. The *Bac*- mutants obtained underwent the tests of activity by the method of diffusion of the wells like by the method of the zymogramme, while using like positive witness, the stocks wild *Bac*+.

The 4 stocks gave zones of inhibition with regard to the stock targets *Listeria innocua* F, by the test of diffusion of the wells with diameters of 14mm, 13mm, 08mm and 16mm, for stocks CH05, CH07, CH08 and CH15 respectively. Like by the method of the zymogramme with zones of inhibition located between 5 and 10KDa. The bacteriocins produced by the three stocks of *lactococcus* are sensitive to the proteases used, while those produced by the *lactobacille* resist it.

The disappearance of the zones of inhibition after the cure of the plasmids, confirms the site plasmidic of the genetic clusters bacteriocins produced by the stocks of *Lactococcus*. In addition, the appearance of the sensitivity of the same stocks to their bacteriocins, after the plasmidic cure, indicates that the genes of immunity are also plasmidic. Lastly, our work is completed with the determination of CMI of the extracts bacteriocinogenic of the two model stocks. The found values are respectively: 14,28 UA/ml and 7,1 UA/ml.

**Key words:** milk of chamelle, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, bacteriocins, zymogramme, plasmidic curing, *Listeria*.

## *Liste des abréviations*

ABC : protéine cassette se liant avec l'ATP.  
Amp : gène de résistance à l'ampicilline.  
APS: Persulfate d'ammonium.  
*B. Cereus* : *Bacillus Cereus*.  
*Bac*<sup>+</sup> : variant producteur de bactériocines.  
*Bac*<sup>-</sup> : variant non producteur de bactériocines.  
*Bac S* : variant sensible à la bactériocine parentale.  
BET: Bromure d'Ethidium.  
BHIB: Bouillon cœur cervelle.  
Pb : Paires de bases.  
BSA : Sérum albumine bovine.  
CMI : Concentration minimale inhibitrice.  
Dha : Didéshydroalanine.  
Dhb : 2, 3-Didéshydrobutyrine.  
DMPG : Dimyristoyl-phosphatidylglycérol.  
EDTA: acide Ethylène diamine tétra acétique.  
EII<sup>tMan</sup> : Mannose perméase du système phosphotransférase  
Em : Erythromycine.  
HPLC: Chromatographie Liquide Haute Performance.  
Imm<sup>+</sup> : variant producteur de la protéine d'auto-immunité.  
IR : séquences répétitives inversées.  
IS : Séquence d'insertion.  
*L. Monocytogenes*: *Listeria monocytogenes*.  
LAB: bactérie d'acide lactique.  
LTR : Longues répétitions terminales.  
MRS: Man Rogosa et Sharp.  
Min: Minute.  
NICE: Nisine Controlled Expression.  
ORF : Open Reading Frame.  
*Ori* : Origine de réplication.  
SDS-PAGE: électrophorèse sur gel de polyacrylamide au sulfate dodécylque de sodium.  
PBS: Phosphate Buffered Saline.  
PHK: Phospho-hexo-kinase.  
*S. Salivarius*: *Streptococcus salivarius*.  
*S. Pyogenes*: *Streptococcus pyogenes*.  
SDS: Dodécyl sulfate de sodium.  
Souche CH: souche isolée à partir du lait de chamelle.  
TEMED: N, N, N', N'-Tetraméthyl ethylènediamine.  
Tn : Transposon.  
TRIS: 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol.  
UTR: untranslated region.  
YGNGV : Tyrosine-Glycine-Asparagine-Glycine-Valine.  
Zi : Zone d'inhibition.

## *Liste des tableaux*

|  |    |
|--|----|
| <b>Tableau I</b> : Distribution des groupes de souches lactiques utilisées pour le test d'activité par la méthode de diffusion des puits après le curage des plasmides ..... | 53 |
| <b>Tableau II</b> : Valeurs des diamètres des zones d'inhibition dues à l'activité bactériocinogène anti-listeria, des souches lactiques étudiées .....                      | 56 |
| <b>Tableau III</b> : résultats de la cure plasmidique en Concentrations minimales inhibitrices .....   | 65 |

## *Liste des figures*

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figure 1</b> : Organisation génétique des clusters de gènes impliqués dans la biosynthèse et la régulation de la biosynthèse des lantibiotiques .....   | 4   |
| <b>Figure 2</b> : Schéma de biosynthèse, de sa régulation et d'immunité de la souche productrice pour la <i>nisine</i> .....   | 5   |
| <b>Figure 3</b> : Schéma de la biosynthèse, la régulation de la biosynthèse et l'immunité des bactériocines de classe IIa .....  | 6   |
| <b>Figure 4</b> : Schéma montrant l'insertion du transposon accompagnée de la duplication d'une séquence cible de l'ADN receveur .....   | 12  |
| <b>Figure 5</b> : Principe du mécanisme de transposition pour les transposons ADN .....  | 14  |
| <b>Figure 6</b> : Principe du mécanisme de transposition pour les rétrotransposons .....   | 16  |
| <b>Figure 7</b> : Formation de pores membranaires par le complexe <i>nisine</i> -lipide II selon .....   | 23  |
| <b>Figure 8</b> : Schéma montrant la structure de la mannose perméase du système phosphotransférase .....  | 25  |
| <b>Figure 9</b> : Mode d'action utilisé par les bactériocines de classe IIa et par les lactococcines A et B (classe II d) .....  | 25  |
| <b>Figure 10</b> : Mode d'action des bactériocines de classe Iia .....   | 27  |
| <b>Figure 11</b> : Modèle d'interaction de la protéine d'immunité avec la mannose perméase phosphotransférase EII <sub>Man</sub> pour les bactériocines de classe IIa et certaines bactériocines de classe II d ( <i>Lactococcines</i> A et B) ..... | 31  |
| <b>Figure 12</b> : schéma résumant le protocole du test de diffusion des puits .....   | 42  |
| <b>Figure 13</b> : schéma résumant le protocole d'inactivation aux protéases .....   | 43  |
| <b>Figure 14</b> : schéma résumant le protocole de purification des bactériocines .....  | 46  |
| <b>Figure 15</b> : schéma détaillé des étapes de préparation de la gamme de dilution de la rifampicine 10X .....   | 49  |
| <b>Figure 16</b> : schéma détaillé des étapes de préparation de la gamme de dilution de la rifampicine 1X .....  | 50  |
| <b>Figure 17</b> : Schéma illustrant les étapes de détermination des CMI des bactériocines .....   | 55  |
| <b>Figure 18</b> : Activité des bactériocines produites par la souche CH05 .....   | 57  |
| <b>Figure 19</b> : Activité des bactériocines produites par la souche CH07 .....   | 58. |
| <b>Figure 20</b> : Activité des bactériocines produites par la souche CH08 .....   | 58. |
| <b>Figure 21</b> : Activité des bactériocines produites par la souche CH5 (et essai de désorption) .....   | 59  |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figure 22</b> : Activité des bactériocines produites par la souche CH07 (avec essai de désorption) .....   | 60  |
| <b>Figure 23</b> : Inactivation aux protéases, des bactériocines produites par la souche CH05.....  | 61  |
| <b>Figure 24</b> : Inactivation aux protéases des bactériocines produites par la souche CH07.....   | 62  |
| <b>Figure 25</b> : Différence d'aspect entre un gel d'agarose ensemencé <b>A</b> par la souche cible et un gel d'agarose stérile <b>B</b> , et qui justifie l'apparition des zones d'inhibition sur le zymogramme ..... | 63  |
| <b>Figure 26</b> : Bandes électrophorétiques ( <b>à gauche</b> ) des deux souches CH05 et CH07 respectivement, ainsi que leurs zones d'inhibition par la technique du zymogramme ( <b>à droite</b> ) .....              | 64  |
| <b>Figure 27</b> : Bandes électrophorétiques ( <b>à gauche</b> ) des deux souches CH08 et CH15 respectivement, ainsi que leurs zones d'inhibition par la technique du zymogramme ( <b>à droite</b> ) .....              | 64  |
| <b>Figure 28</b> : Résultat de l'électrophorèse de l'ADN bactérien total et illustrant les profils plasmidiques pour les variants CH05 (A), CH05 curée (A'), CH07 (B) et CH07 curée (B'). .....                         | 66  |
| <b>Figure 29</b> : Disparition de l'activité bactériocinique de la souche CH07 après la cure plasmidique .....  | 67  |
| <b>Figure 30</b> : Disparition de l'activité bactériocinique de la souche CH05 après la cure plasmidique .....  | 68  |
| <b>Figure 31</b> : Disparition de la zone d'inhibition après la cure plasmidique de la souche CH07, par la méthode du zymogramme .....  | 69  |
| <b>Figure 32</b> : Disparition de la zone d'inhibition après la cure plasmidique de la souche CH07, par la méthode du zymogramme .....  | 70  |
| <b>Figure 33</b> : Disparition, par effet de la cure plasmidique, de la bande protéique correspondant à la bactériocine produite par la souche CH07 .....   | 71  |
| <b>Figure 34</b> : Immunité de la souche CH05 à sa propre bactériocine ( <b>A</b> ) et la sensibilité de son variant curé à la bactériocine parentale ( <b>B</b> ), par la méthode de diffusion sur puits .....         | 72  |
| <b>Figure 35</b> : Immunité de la souche CH07 à sa propres bactériocine ( <b>A</b> ) et la sensibilité de son variant curé à la bactériocine parentale ( <b>B</b> ), par la méthode de diffusion sur puits .....        | 72  |
| <b>Figure 36</b> : Détermination de la CMI de la suspension bactériocinique de la souche CH05, par la méthode du titrage sur milieu gélosé .....  | 73  |
| <b>Figure 37</b> : Détermination de la CMI de la suspension bactériocinique de la souche CH07, par la méthode du titrage sur milieu gélosé .....  | 74. |

## *Liste des annexes*

**Annexe 1 :** listes du Matériel et réactifs utilisés.

**Annexe 2:** Composition des réactifs et des colorants.

**Annexe 3 :** Composition des réactifs utilisés pour l'extraction de l'ADN bactérien.

**Annexe 4:** Composition des milieux de culture utilisés.

**Annexe 5:** Préparation du gel tricine SDS-PAGE.

**Annexe 6 :** Répartition des échantillons sur le gel d'électrophorèse des bactériocines.

**Annexe 7 :** Répartition des échantillons sur le gel d'agarose pour l'électrophorèse de l'ADN bactérien.

**Annexe 8 :** Composition du gel 20% utilisé en PAGE-SDS pour la séparation des bactériocines, des autres protéines bactériennes.

**Annexe 9:** Tableau d'identification des acides aminés et leur représentation abrégée.

# *Table des matières*

|                                   |          |
|-----------------------------------|----------|
| <b>Introduction générale.....</b> | <b>1</b> |
|-----------------------------------|----------|

## **Chapitre I : synthèse bibliographique.**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Les éléments génétiques codant les bactériocines .....</b>                   | <b>7</b>  |
| I-1-Le chromosome.....  | 7         |
| I-2-Les éléments non chromosomiques .....                                       | 7         |
| I-2-1-Les plasmides .....   | 7         |
| I-2-1-1-Définition .....  | 7         |
| I-2-1-2-Caractéristiques générales .....  | 8         |
| I-2-1-3-Propriétés des plasmides des bactériocines .....                        | 8         |
| I-2-2-Les transposons .....   | 10        |
| <b>Modes d'action des bactériocines .....</b>                                   | <b>18</b> |
| 1-Rôle des différentes régions de la bactériocine .....                         | 18        |
| 2-Le spectre d'activité.....  | 21        |
| 3-Mode d'action .....   | 22        |
| 3-1-Mode d'action des différentes classes de bactériocines .....                | 22        |
| 3-1-1-Mode d'action des bactériocines de classe I .....                         | 22        |
| 3-1-2-Mode d'action des bactériocines de classe II .....                        | 24        |
| 3-1-3-Mode d'action des bactériocines de classe III .....                       | 27        |
| 3-2-Quantification de l'activité antibactérienne .....                          | 27        |
| 3-2-1-Détermination du titre en bactériocines.....                              | 27        |
| 3-2-2-Facteurs physico-chimiques influençant l'activité des bactériocines ..... | 28        |
| <b>L'auto-immunité et la résistance aux bactériocines .....</b>                 | <b>30</b> |
| 1-L'auto-immunité .....   | 30        |
| 1-1-L'auto-immunité des lantibiotiques .....                                    | 30        |
| 1-2-L'auto-immunité des bactériocines de classe II .....                        | 30        |
| 2-La résistance aux bactériocines .....   | 32        |
| 2-1-Les différents types de résistants .....                                    | 33        |
| 2-2-Les caractéristiques des résistants .....                                   | 34        |
| 2-3-Le mécanisme de résistance des cellules cible aux bactériocines.....        | 35        |
| 2-3-1-La résistance aux lantibiotiques .....                                    | 35        |
| 2-3-2-La résistance aux bactériocines de classe IIa .....                       | 36        |
| 2-3-3-Les cross-résistances .....   | 37        |

## Chapitre II : Partie expérimentale

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Matériels et méthodes .....</b>   | <b>38</b> |
| 1-Matériels.....   | 38        |
| 1-1-Matériel biologique .....  | 38        |
| 1-2-Appareillage .....   | 38        |
| 2-Méthodes.....  | 39        |
| 2-1-Revivification des germes.....   | 39        |
| 2-2-Test d'activité par la méthode de diffusion des puits .....  | 39        |
| 2-2-1- Préparation du surnageant actif .....   | 39        |
| 2-2-2- Préparation de l'inoculum de la souche indicatrice .....  | 39        |
| 2-2-3-Réalisation du test .....  | 40        |
| 2-2-4-Confirmation de la nature protéique des bactériocines .....  | 40        |
| 2-3-Purification des bactériocines .....   | 44        |
| 2-3-1-Ensemencement des bactéries lactiques productrices de bactériocines .....  | 44        |
| 2-3-2-Séparation des bactériocines par Electrophorèse PAGE-SDS .....   | 44        |
| 2-3-3-Expression de l'activité antimicrobienne par la technique du zymogramme .....  | 44        |
| 2-4-Caractérisation génétique des bactériocines par la méthode de la cure plasmidique.....   | 47        |
| 2-4-1-Cure des plasmides .....   | 47        |
| 2-4-2-Contrôle de la cure .....  | 51        |
| 2-4-2-1-Extraction de l'ADN bactérien .....  | 52        |
| 2-4-2-2-Electrophorèse de l'ADN bactérien .....  | 53        |
| 2-4-3-Confirmation de la localisation génétique des bactériocines par le test d'activité par la méthode de diffusion des puits ..... | 53        |
| 2-4-4-Confirmation de la localisation génétique des bactériocines par la technique du zymogramme .....                               | 53        |
| 2-5-Caractérisation génétique des protéines d'immunité aux bactériocines .....   | 54        |
| 2-6-Détermination de la concentration minimale inhibitrice des bactériocines en unité arbitraire (U.A/ml) .....                      | 54        |
| <b>Résultats et discussions .....</b>  | <b>56</b> |
| 1-Test d'inhibition par la méthode de diffusion des puits et sensibilité aux protéases .....   | 56        |
| 2-Purification des bactériocines et test d'activité par la technique du zymogramme .....   | 62        |
| 3-Caractérisation génétique des bactériocines .....  | 65        |
| 3-1-Vérification de la cure plasmidique.....   | 66        |
| 3-2-Caractérisation génétique des bactériocines par le test d'activité par la diffusion des puits .....                              | 67        |
| 3-3-Caractérisation génétique des bactériocines par la technique du zymogramme.....  | 69        |
| 4-Caractérisation génétique de l'immunité aux bactériocines .....  | 71        |
| 5-Détermination des concentrations minimales inhibitrices des bactériocines .....  | 73        |
| <b>Conclusion .....</b>  | <b>75</b> |

### Références bibliographiques

### Annexes

# Introduction générale

La résistance bactérienne aux agents antimicrobiens apparaît de nos jours comme une des préoccupations majeures de santé publique. L'émergence et la dissémination de souches bactériennes résistantes résultent de l'usage anarchique et abusif des antibiotiques conventionnels, combiné aux nombreuses mutations génétiques qui surviennent dans le monde bactérien (PERRETEN *et al.*, 1997). L'étendue de cette résistance est renforcée par le retard enregistré dans le développement et l'élaboration de nouveaux agents antimicrobiens (DIMARCQ *et* HOFFMANN, 2001).

Afin d'éradiquer cette résistance sans cesse croissante, il devient impératif et urgent de développer de nouvelles classes de composés antimicrobiens. À cet égard, l'utilisation des peptides antimicrobiens est préconisée en raison de leur capacité à contenir l'apparition de la résistance au sein des souches bactériennes impliquées (PAPAGIANI, 2003; YEAMAN *et* YOUNT, 2003). De par leur nature, leur variété et leurs différents mécanismes d'actions, les peptides antimicrobiens notamment les bactériocines représentent une alternative intéressante parmi les nouvelles stratégies de contrôle de la multirésistance bactérienne aux antibiotiques (TWOMEY *et al.*, 2002 ; PAPAGIANI, 2003; NASCIMENTO *et al.*, 2005 ; TRAUTNER *et al.*, 2005).

Les bactériocines sont des peptides ou protéines produites par des genres bactériens possédant des activités antimicrobiennes, habituellement spécifiques et contre les bactéries des espèces apparentées, sans être létales à la souche productrice (BAYOUB *et al.*, 2006). L'utilisation des bactériocines dans le domaine alimentaire est avantageuse non seulement en raison de leur large spectre d'activité, mais aussi parce qu'elles sont non toxiques, facilement dégradables par les enzymes digestives et ne compromettent pas la prise des médicaments (RYAN *et al.*, 1998). La combinaison de bactériocines avec des traitements physiques, comme le traitement à haute pression ou dans un champ électrique, offre une conservation plus efficace des produits alimentaires, fournissant ainsi une barrière complémentaire aux formes les plus résistantes comme les endospores bactériennes (GALVAREZ *et al.*, 2007).

Aujourd'hui les bactériocines des bactéries Gram-positives répertoriées dans la littérature sont plus nombreuses que celles des bactéries Gram-négatives, sans doute parce qu'elles ont été plus recherchées. Ce sont des peptides bactéricides généralement d'une taille inférieure à 10 Kda, cationiques, amphiphiles, et agissent en perméabilisant la membrane des cellules cibles (NES *et al.*, 1996). Parmi ces bactériocines, celles produites par les bactéries lactiques (BAL) ont reçu un intérêt particulier en raison des possibilités qu'elles offrent d'applications potentielles comme conservateurs naturels dans l'industrie alimentaire (ENNAHAR *et al.*, 2003).

La production de bactériocines par les bactéries lactiques a été démontrée par plusieurs auteurs, après expression vis-à-vis d'une bactérie cible appartenant le plus souvent au genre *Listeria*, par la méthode de diffusion des puits (GALVEZ *et al.*, 2007) et par le dépôt de disques imprégnés du surnageant de la culture bactérienne (LABIOUI *et al.*, 2005).

Cependant, très peu de travaux sont effectués sur les bactéries lactiques bactériocinogènes issues du lait de chamelle.

L'exploitation du lait camelin comme source d'isolement de bactéries lactiques bactériocinogènes découle de plusieurs caractéristiques propres à ce produit, d'abord, ce lait est caractérisé par sa richesse en composés antimicrobiens naturels dont le système enzymatique lactopéroxydase, ce qui diminue la charge microbienne totale, d'où sa longue conservabilité. De plus, les conditions de la traite et d'entreposage de cette denrée laissent supposer la puissance d'un système antimicrobien performant engendrant une certaine stabilité microbiologique de ce produit.

D'autre part, le lait de chamelle est un milieu favorable pour la croissance d'une flore bactérienne protectrice. Contrairement au lait de vache, le lait camelin est caractérisé par son pH peu acide. Pour toutes ces raisons, nous avons donc utilisé cette source pour la caractérisation de bactériocines anti-*listeria*. Nous avons, d'autre part choisi ce germe comme souche cible, car il s'agit d'un pathogène alimentaire psychrophile pouvant se développer même aux températures de réfrigération (+4°C). Ce qui influence la qualité hygiénique et la conservation des produits alimentaires. Ceci nous a motivés vers la recherche d'agents anti-*listeria* par l'utilisation d'une souche physiologiquement proche du pathogène *Listeria monocytogènes* afin d'éviter le risque de contamination vu le manque de moyen préventifs suffisants dans notre laboratoire, il s'agit de la souche *Listeria innocua*. F collectée à l'université de Nantes.

Ce travail de recherche se déroule au laboratoire de Microbiologie Appliquée de l'Université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou, et consiste à caractériser des bactériocines anti-*listeria* produites par des souches lactiques des genres *Lactococcus* et *Lactobacillus* isolées à partir du lait de chamelle *Camelus dromedarius* de la région de BISKRA. Il est à noter que ce travail fait suite aux démarches d'IRID et AMMAR réalisées en 2009, dans lesquelles, les échantillons frais du lait camelin ont été ramenés de la région de BISKRA et les souches lactiques ont été isolées et caractérisées. Dans le même travail, les caractéristiques physico-chimiques du lait camelin ont été étudiées et donc les conditions de culture des souches lactiques sont connues. D'autre part, une présentation détaillée du germe cible *Listeria* ainsi qu'une classification des bactériocines ont été faites

Dans le présent manuscrit, nous nous sommes basés sur l'identification des bactériocines produites par ces souches, notamment le volet génétique. C'est la raison pour laquelle nous avons consacré la majeure partie de la synthèse bibliographique pour la présentation de l'organisation des locus génétiques codant ces molécules.

Notre démarche pratique est orientée vers l'utilisation de protocoles simples et réalisables afin de pouvoir obtenir les données nécessaires quant à la nature chimique et la localisation génétique des bactériocines produites par ces souches lactiques.

Pour se faire, on se propose de réaliser les manipulations suivantes :

- Test d'activité sur milieu solide par la méthode de diffusion des puits ;
- Curage des plasmides en vue de caractériser la localisation génétique des bactériocines ;
- Séparation électrophorétique suivie d'un test d'activité par la méthode du zymogramme.

# Chapitre I :

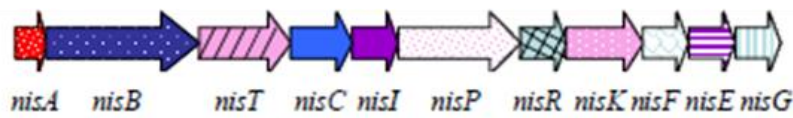
## Synthèse bibliographique

Les éléments génétiques  
codant les bactériocines

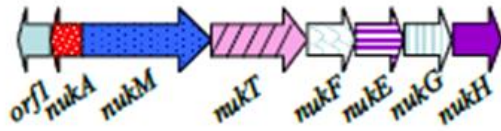
Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens synthétisés par voie ribosomale et les gènes impliqués dans leur production sont organisés en une ou plusieurs structures opérons qui peuvent être localisées sur le chromosome bactérien ou le plus souvent sur un plasmide (MERZOUG *et al.*, 2010). Ces gènes peuvent être insérés sur le chromosome à partir d'un plasmide, par l'intermédiaire de transposons (TESSEMA *et al.*, 2011).

La comparaison des clusters génétiques de plusieurs bactériocines révèle un certain nombre de gènes conservés codant pour des protéines avec des fonctionnalités similaires. L'organisation du locus impliqué dans la production d'une bactériocine consiste au minimum en un gène de structure, généralement co-transcrit avec son gène d'immunité qui protège la souche productrice des effets de la bactériocine. Habituellement, un autre groupe de gènes comporte les éléments nécessaires au transport dédié et parfois un troisième locus correspond à un système régulation qui permet l'induction de la production de la bactériocine (MORISSET *et al.*, 2005). Dans le cas des lantibiotiques, on trouve aussi les gènes codant pour les enzymes responsables des modifications post-traductionnelles (BELGUESMIA *et al.*, 2011).

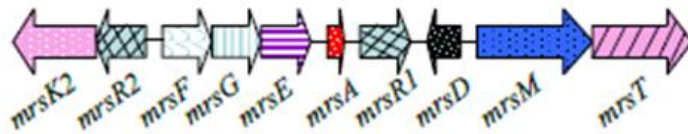
Les deux figures 1 et 2 montrent les schémas d'organisation des clusters génétiques des lantibiotiques et leurs voies de biosynthèse et de régulation respectivement, tandis que la figure 3 schématise les modes de biosynthèse et de régulation pour les bactériocines de classe IIa.



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



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



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

**Production**

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

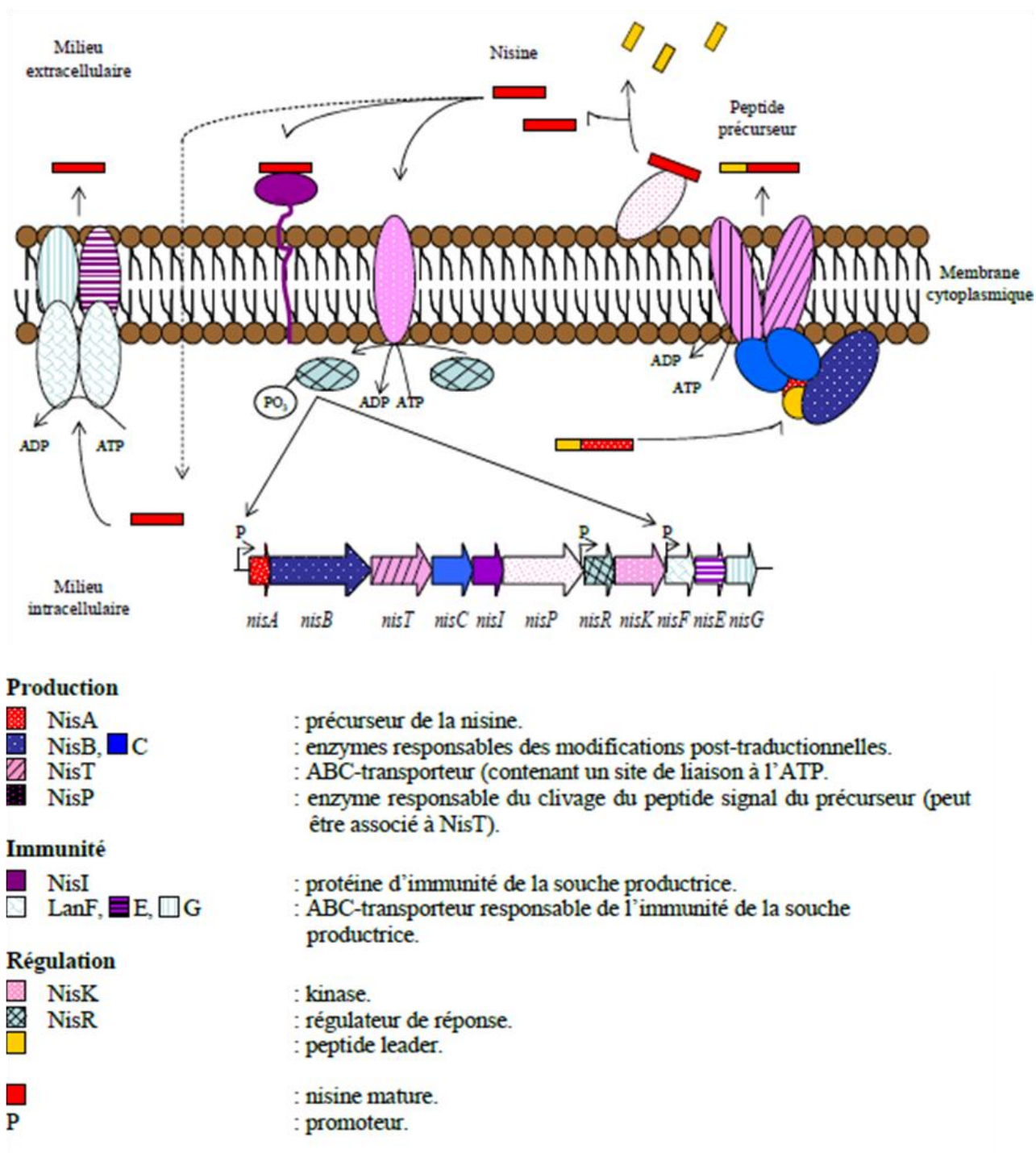
**Immunité**

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

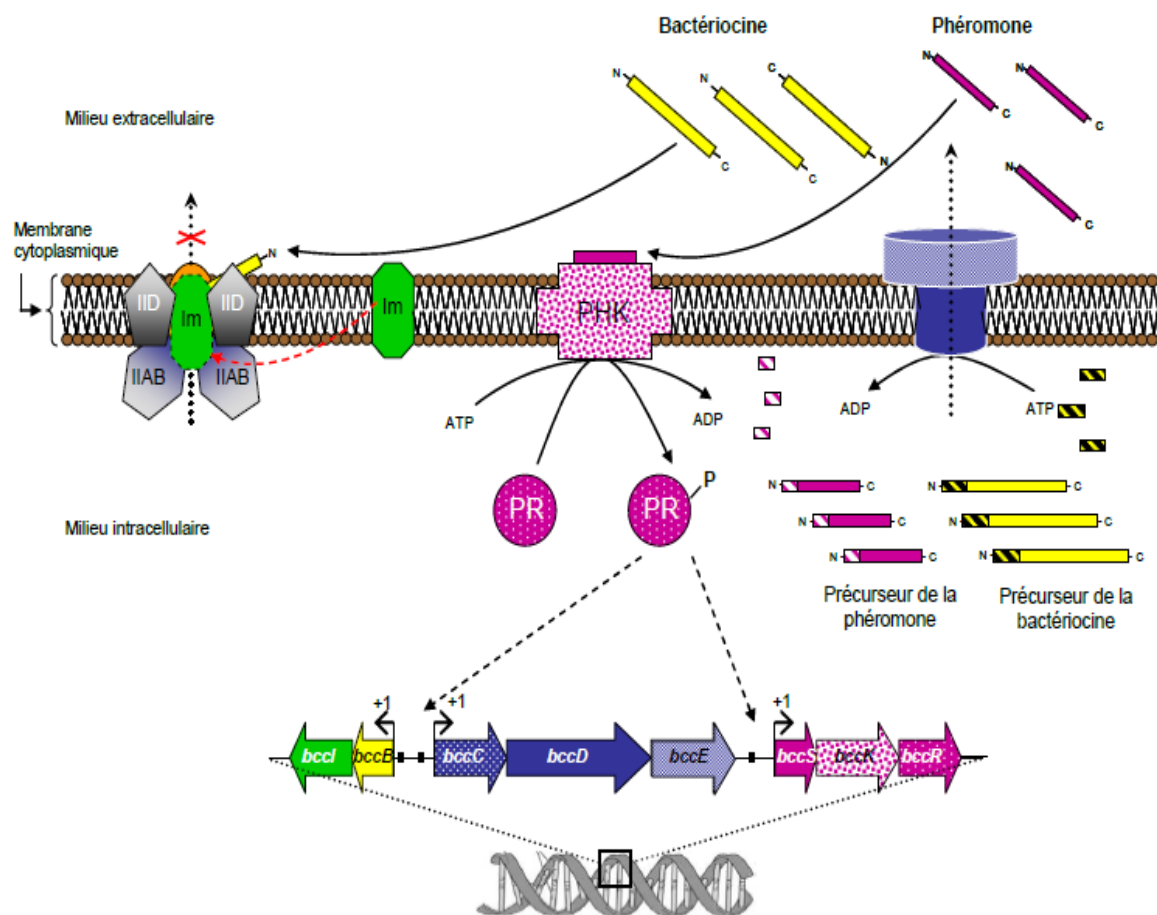
**Régulation (système à 2 composants)**

- LanK : kinase.
- LanR : régulateur de réponse.

**Figure 1** : Organisation génétique des clusters de gènes impliqués dans la biosynthèse et la régulation de la biosynthèse des lantibiotiques (ASADUZZAMAN et SONOMOTO, 2009).



**Figure 2 :** Schéma de biosynthèse, de sa régulation et d'immunité de la souche productrice pour la *nisine* (WIDDICK *et al.*, 2003).



- : précurseur de la bactériocine/ bactériocine.
- : immunité.
- : export.
- : régulation.
- : IIAB, IIC, IID ; sous-unités de EII<sup>Man</sup>.
- : promoteur.

Im : protéine d'immunité.

PHK : protéine senseur histidine kinase.

PR : protéine effectrice régulatrice.

*Bcc* : système génétique impliqué dans la biosynthèse et la régulation de la biosynthèse d'une bactériocine de classe IIa.

**Figure 3 :** Schéma de la biosynthèse, la régulation de la biosynthèse et l'immunité des bactériocines de classe IIa (STRAUME *et al*, 2007).

La biosynthèse d'une bactériocine nécessite l'action d'une multitude de gènes dont les produits peuvent interagir selon des mécanismes complexes très peu connus. Ces gènes codent pour des protéines d'induction, de structure, de modification (dans le cas des antibiotiques), de transport, de clivage et d'immunité. Dans le cas de la *nisine*, la biosynthèse

est initiée par l'émission d'un signal provoqué par un facteur d'induction. La protéine membranaire, souvent une histidine kinase, effectue la phosphorylation lors de la reconnaissance du peptide inducteur qui interagit avec les promoteurs situés sur l'opéron de la bactériocine. Il a également été démontré que les biosynthèses de la *nisine* et de la *carnobactériocine B2* sont induites par la bactériocine elle-même (NEVES *et al.*, 2005).

Tandis que chez les bactériocines de classe II, la biosynthèse est induite suite au clivage d'un peptide leader inactif et similaire à la bactériocine (KJOS *et al.*, 2011). Le transport des bactériocines à l'extérieur de la cellule est assuré selon deux mécanismes distincts. Des transporteurs de type ABC (« *ATP-Binding Cassette* ») identifiés chez *Streptococcus mutans* 286 et 287 sont préférentiellement utilisés lors de la biosynthèse des mutacines non-lantibiotiques (TAGG *et al.*, 2005).

Toutefois, un nombre restreint de bactériocines à l'exemple de l'*acidicine B* et de l'*enterocine P* sont sécrétées via la voie *sec* dépendante (HERRANZ *et* DRIESSEN, 2005). À la suite de la sécrétion des bactériocines matures, l'immunité est conférée à la souche productrice grâce à des protéines d'immunité dont le mécanisme d'action exact reste peu connu.

## 1-Le chromosome

La localisation des gènes de bactériocines peut être chromosomique comme dans le cas de la *Carnobactériocine BMI* (JASNIEWSKI, 2008). Les gènes impliqués dans la production sont généralement organisés sous forme d'opéron. Les gènes de structure et le gène d'immunité qui inhibe l'action de la bactériocine produite, sont le plus souvent co-transcrits sauf quand ils sont disjoints comme dans le système *Carnobactériocine A* (DORTU *et* THONART, 2008). Les éléments nécessaires au transport de la bactériocine sont localisés sur un autre locus. Un troisième locus codant le système de transduction du signal a pu être identifié et permettrait l'induction de la production du peptide antimicrobien (DIEP *et al.*, 2002 ; EIJSINK *et al.*, 2002).

L'analyse par PCR du génome d'une souche de *Lactobacillus plantarum C11*, a démontré la localisation chromosomique du cluster génétique des gènes codant la *plantaricine* (BEN OMAR *et al.*, 2006). De même que pour l'*entérocin AS-48* produite par *Enterococcus faecium* isolée du fromage de chèvre, et active contre *L. Monocytogenes* et *B. Cereus* (ABRIOUEL *et al.*, 2005).

## 2-Les éléments non chromosomiques

### 2-1-Le plasmide

#### 2-1-1-Définition

Un plasmide désigne en microbiologie ou en biologie moléculaire une molécule d'ADN surnuméraire distincte de l'ADN chromosomique, capable de répllication autonome (c'est à dire indépendamment du génome bactérien), et non essentielle à la survie de la cellule (PAOLETTI *et al.*, 2003).

Les plasmides sont de petits fragments d'ADN double brin, présents dans la cellule bactérienne (MEDRAOUI, 2012). Les plasmides sont généralement circulaires comme ils peuvent aussi exister sous forme linéaire capable d'utiliser la machinerie de leur hôte pour se

répliquer. Les plus connus sont bien sûr les plasmides bactériens, largement utilisés en biologie moléculaire comme vecteurs pour amplifier et transporter les ADN manipulés (GRAZIANI, 2002).

Une cellule bactérienne peut en contenir une copie, pour les grands plasmides, ou des centaines pour des plasmides artificiels (construits par génie génétique à des fins de clonage de gènes). Les bactéries en comportent généralement 5 à 30 copies, les levures entre 50 et 100 exemplaires par cellule. Le nombre de copies d'un même plasmide dans une cellule bactérienne est contrôlé par la fonction *Ori* de l'origine de la réplication. Lorsque ce nombre est très élevé, de fortes homologues ADN/ADN apparaissent.

Puisque la réplication de ces plasmides est soumise au même système de régulation, ils ne peuvent pas coexister dans une même cellule, on dit qu'ils sont incompatibles. Les plasmides sont ainsi classés en groupe d'incompatibilité *Inc* (BELKADI, 2010). Par conséquent, plusieurs plasmides différents peuvent coexister dans une même cellule sous conditions de leur compatibilité mutuelle. Certains plasmides sont capables de s'intégrer aux chromosomes ; on appelle ces plasmides des épisomes (BELKADI, 2010).

### 2-1-2-Caractéristiques générales

Les plasmides possèdent plusieurs propriétés conférant aux bactéries une meilleure adaptation à l'environnement en portant des gènes codant des fonctions accessoires utiles mais non indispensables au métabolisme normal de la cellule hôte (BELKADI, 2010). La réplication d'un plasmide est effectuée par la machinerie cellulaire mais l'origine de réplication et certains facteurs de réplication sont propres au plasmide. Le nombre de copies du plasmide est ainsi défini par le plasmide lui-même.

Un système simple de stabilisation consiste donc à augmenter le nombre de copies de sorte que leur distribution aléatoire permette d'en retrouver au moins un dans chaque cellule fille après la division (VAN MELDEREN, 2002).

En effet, la probabilité qu'une cellule se retrouve sans copie du plasmide est de  $2^{-n}$  où  $n$  est le nombre de copies avant la division. Ainsi, un plasmide présent en 10 copies risque d'être perdu toutes les 1024 divisions. Avec 20 copies, cette probabilité tombe à moins d'une chance sur un million (probabilité encore diminuée par l'encombrement volumique des plasmides dans la cellule) (HAYES, 2003).

Les plasmides participent aux transferts horizontaux de gènes entre les populations bactériennes, et donc à la dissémination des gènes conférant des avantages sélectifs (par exemple des résistances aux antibiotiques ou des facteurs de virulence). La mobilité des plasmides (par conjugaison) au sein des populations bactériennes accroît le spectre d'hôte des gènes impliqués dans la virulence (plasmides conjugatifs). Ces gènes offrent en contrepartie un avantage sélectif pour le plasmide et les bactéries hôtes. On conçoit donc la nature quasi ubiquitaire et persistante des plasmides chez les bactéries pathogènes (RICK, 2005).

### 2-1-3-Propriétés des plasmides des bactériocines

Autres les propriétés de résistance aux antibiotiques, les plasmides codent des fonctions accessoires, comme les fonctions de virulence (JOHNSON *et al.*, 2009), d'adhésion aux cellules épithéliales (DUDLEY *et al.*, 2006), de dégradation de certains métabolites

(CLEASSON *et al.*, 2006 ; JONES *et al.*, 2007 ; LI *et al.*, 2007 ; FANG *et al.*, 2008) et la production de bactériocines (MILLET *et al.*, 2008 ; OSHIMA *et al.*, 2008 ; SMAJS *et al.*, 2008 ; CHEIKHYOUSSEF *et al.*, 2010 ).

Les plasmides des bactériocines codent la synthèse d'une protéine extracellulaire dont la biosynthèse est létale pour la bactérie productrice ainsi que pour les autres bactéries nonproductrices environnantes. Cependant, ces plasmides codent aussi une deuxième protéine intracellulaire de résistance à cette première toxine (LIPPS, 2008). Les bactériocines agissent sur des fonctions vitales de la bactérie. Chez *E. coli*, on trouvera différentes catégories de bactériocines, comme les colicines codées par les plasmides *col*. La caractérisation de nouvelles bactériocines à large spectre et le développement de variant par le génie génétique a offert de nouvelles opportunités biotechnologiques.

Dans l'industrie agroalimentaire, l'application des bactériocines et des cultures protectrices a pu réduire l'incidence des pathogènes alimentaires, et améliorer la protection des produits animaux par la réduction de la transmission des bactéries pathogènes dans la chaîne alimentaire (GALVEZ *et al.*, 2010). Ainsi, pour savoir maîtriser le rendement des souches en bactériocines, les scientifiques agissent sur les déterminants génétiques codant ces biomolécules, et pour se faire, une caractérisation de la localisation chromosomique ou plasmidique nécessite d'être effectuée. Dans la majeure partie, l'information génétique est portée par un plasmide.

La *mesentéricine* Y105 est une petite bactériocine non-lantibiotique (de classe II) codée par un plasmide de 35 Kb porté par *Leuconostoc mesenteroides* Y105, et active contre *Listeria Monocytogenes* (FREMAUX, 2006).

En utilisant la RT-PCR, on a cloné un fragment *Dra II* de 8Kb, il contient le gène de structure de la *mesentericine* Y105, *mesY*, codant le précurseur de la bactériocine avec une extension de 24 AA N-terminaux se terminant par un motif double Glycine (*Gly-Gly*) formant le site de clivage du peptide leader ce qui fait que cette bactériocine appartient à la classe II, quatre autres gènes sont associés à *mes Y*, dans deux opérons divergents. Par addition à *mes Y*, le premier opéron est présumé codant une protéine similaire à celle codée par l'*ORF2* de l'opéron de la *leucocine A*. Le deuxième opéron contient trois *ORFs*, les deux premiers, *mes D* et *mes E* codant respectivement le système transporteur ABC et le facteur accessoire, quant au troisième, son rôle n'a pas encore été caractérisé (YANN, 2005).

Les résultats concernant l'expression hétérologue de *mes Y* cloné dans la souche *Lactobacillus NCK64* suggèrent que les fonctions de sécrétion et de maturation dédiées pour la *lacticine F* (une autre bactériocine de classe II), sont bien efficaces pour la *mesentéricine* Y105, cette caractéristique est très intéressante pour le développement de starters de ferments industriels produisant de multiples activités bactéricides (CENATIEMPO, 2005).

Des études récentes ont démontré le caractère de production de bactériocine par un mégaplasmide *pMP118* chez la souche lactique *Lactobacillus salivaris* UCC118 (ZHANG *et al.*, 2010). Les fonctions codées par le mégaplasmide sont aussi retrouvées dans le rôle probiotique de la souche, et les mêmes études ont rapporté que le système bactériocine codé par ce plasmide a une activité contre le pathogène alimentaire *Listeria Monocytogenes* (CORR *et al.*, 2007).

PHILIP *et al* (2010) ont obtenu des résultats intéressants quant à la localisation génétique d'un cocktail de bactériocines (BLIS : *Bacteriocin-like inhibitory substances*) produites par une souche de *Streptococcus salivarius*.

Les locis génétiques sont retrouvés sur des grosses molécules d'ADN extra chromosomiques appelées mégaplasmides dont les tailles sont estimées entre 160 et 220 Kb. Ces mégaplasmides sont extrêmement diversifiés par leurs tailles et leurs compositions et sont essentiellement caractérisés comme des répertoires génétiques du caractère bactériocinogène des souches de *S. Salivarius*. Leur remarquable caractéristique est leur contenu en locis codant les lantibiotiques, il s'agit de *Sala* (codant la *Salivaricine A*), *SalB* (codant la *Salivaricine B*), *Salivaricine G32*, *Salivaricine 9* et *Streptine* (WESCOMBE *et al.*, 2006).

*SalA1*, un variant de *Sala* a été étudié, une souche de *S. Pyogenes* contenant le loci *SalA1* perturbé ou tronqué était incapable de produire la bactériocine active (PHILIP *et al.*, 2010). D'autre part, le gène *SalY* codant la protéine d'immunité de *Sala* apparaît fonctionnel dans la majorité des souches de *S. Pyogenes* (PHILIP *et al.*, 2010) ainsi des travaux récents ont postulé que *SalY* est important à la survie des souches en leur conférant une protection intracellulaire vis à vis de l'action destructrice des peptides cationiques (PHELPS *et al.*, 2007). Dans les travaux réalisés par HENG (2010), il a été démontré que *SalY* est aussi exprimé par une souche de *S. Salivarius* en absence de l'expression de la molécule bioactive *Sala*. Pour *S. Salivarius*, cependant, il apparaît probablement que, l'expression de *SalY* confère un avantage de survie à la bactérie hôte en compétition avec les autres bactéries productrices de *Sala* dans la même niche.

La *Salivaricine B*, un lantibiotique auto-inductible de 2,740 Kda et codé par huit locis génétiques qui sont typiquement adjacents du locus *SalA2* dans l'ADN du mégaplasmide (HYINK *et al.*, 2007).

*SalB* a une activité bactéricide contre *S. Pyogenes* (HYINK *et al.*, 2007). Des locis hautement homologues à ceux codant *SalB* ont été identifiés et partiellement caractérisés dans deux souches de *Streptococcus mitis* (HENG, 2010).

Il est ainsi spéculé que le locus codant *SalB* est originaire de *S. Mitis* ou acquis par cette dernière à partir de *S. Salivarius* via une transformation naturelle (HENG, 2010).

Le mégaplasmide *pSsalK12* (codant *Sala* et *SalB*) porté par la souche probiotique *S. Salivarius K12* a été montré comme transmissible entre les bactéries *S. Salivarius in vitro* et *in vivo* (BISHOP *et al.*, 2009).

## 2-2-Les transposons

La première évocation de gènes mobiles venait d'expériences de génétique chez le maïs. Lors de caractérisation de plasmide, il a été observé d'étranges recombinaisons de gènes de résistance aux antibiotiques tel le gène *amp*, s'accompagnant du même accroissement de taille du plasmide receveur. On avait la preuve directe d'une addition de matériel génétique (10Kb) (PHILIPPON *et* PROTS, 2002 ; PRESCOTT *et al.*, 2004).

Par définition, les transposons sont des séquences d'ADN capables de changer de localisation dans le génome sans jamais apparaître à l'état libre. Ils ne peuvent se répliquer mais codent pour les déterminants de la transposition et ceux d'autres fonctions telle la résistance aux antibiotiques et la production de bactériocines (WATSON *et al.*, 2009).

La transposition est un mécanisme d'évolution rapide consistant dans l'addition pure et simple de gènes (ADN) de taille définie au sein d'un génome (chromosome bactérien ou plasmide) et en l'absence d'homologie de séquences nucléotidiques (recombinaison illégitime) (PHILIPPON *et* PROTS, 2002). Selon WESSLER *et al* (2010), certains segments d'ADN bien individualisés sont des éléments génétiques transposables, ou transposons : présents en un point d'un réplicon, chromosome ou plasmide, ils sont capables d'aller s'insérer ailleurs sur le même réplicon ou sur un réplicon différent. Ces éléments mobiles n'ont pas d'existence autonome stable. Leur seule façon de subsister dans une bactérie est de s'intégrer dans un réplicon et d'être dupliqués avec lui.

Le séquençage de pSsalK12, un mégaplasmide de *S. Salivaius K12*, a mis en évidence la présence de plusieurs éléments génétiques mobiles (séquences d'insertion : IS), qui flanquent les locis des deux bactériocines *Salivaricine A* et *Salivaricine B*, ce qui induit l'acquisition de ces locis par d'autres bactéries hôtes par le mécanisme de transposition (HYINK *et al.*, 2007).

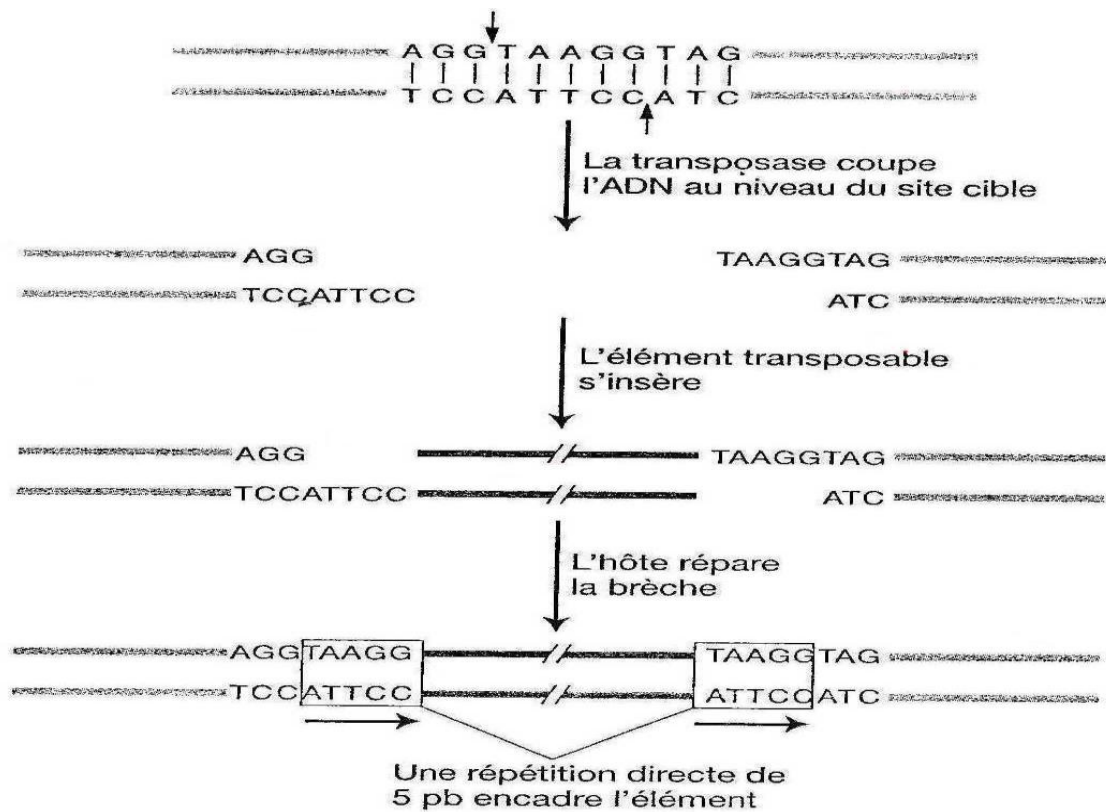
### 2-2-1-Structure des transposons

Le transposon est constitué d'un fragment d'ADN limité de part et d'autre par des séquences répétitives inversées (IR) appartenant à des séquences d'insertion (IS). Les séquences d'insertion portent les gènes nécessaires à la transposition, la transposase (éléments régulateurs de la transposition) et les marqueurs spécifiques (ex : résistance aux antibiotiques et production de bactériocines) (BELKADI, 2010).

Il faut d'ailleurs noter que le résultat final d'un événement de transposition est l'insertion du transposon entre deux paires de bases de l'ADN cible : il s'agit donc d'une addition et non d'un échange de matériel génétique (RAISONNIER, 2007). Deux caractéristiques sont communes à tous les transposons (à l'exception des transposons conjugatifs).

D'une part, ils possèdent des séquences répétées inversées à leurs extrémités, dont la taille varie d'une à plusieurs dizaines de Pb. D'autre part, l'insertion d'un transposon conduit toujours à la duplication d'une courte séquence de l'ADN receveur, appelée séquence cible. Avant l'événement de transposition, une seule copie de la séquence cible est présente sur l'ADN receveur et cette séquence est absente du transposon lui même.

Après transposition, le transposon se retrouve encadré par cette séquence, orienté dans un même sens. La longueur de la séquence cible varie d'un transposon à l'autre, mais est identique pour toutes les insertions d'un même transposon. Elle est de 5 ou de 9 Pb pour la plupart des transposons (RAISONNIER, 2007).



**Figure 4 :** Schéma montrant l'insertion du transposon accompagnée de la duplication d'une séquence cible de l'ADN receveur (RAISONNIER, 2007).

### 2-2-2-Le mécanisme de la transposition

La série de réactions qui permet l'intégration des transposons dans une molécule d'ADN cible est illustrée dans la figure 4. La première étape consiste en un clivage de l'ADN receveur au niveau de la séquence cible, avec un décalage de quelques bases (5 ou 9 pour la majorité des transposons) (STANILA, 2003). Le transposon prend place dans la brèche ainsi créée. Enfin les lacunes d'ADN simple brin sont comblées et les différents segments d'ADN réunis par ligation.

Pour un transposon donné, la séquence cible est différente à chaque événement de transposition. Ce fait est remarquable. Il signifie qu'un transposon a la propriété de pouvoir s'intégrer en de multiples points d'une molécule d'ADN et, plus généralement, d'un génome (MATINCA *et* STANILA, 2002).

Cependant de nombreux transposons ne s'intègrent pas tout à fait au hasard mais dans certains sites privilégiés ou points chauds (*hot-spots*). Il semble que ces derniers correspondent à des zones où la conformation de l'ADN est propice au processus de transposition (WESSLER *et al.*, 2010).

En faveur de cette hypothèse, il faut signaler que nombre de points chauds soient d'une particulière richesse en bases adénine et thymine. On sait, en effet, que les régions riches en adénine et thymine possèdent une plus grande plasticité que les régions riches en cytosine et guanine. La fréquence de transposition d'un élément génétique transposable est généralement faible, autour de  $10^{-3}$  à  $10^{-4}$  par génération bactérienne chez *E. Coli*, à 37°C.

Un contrôle des événements de transposition est vital pour la bactérie hôte, en effet, la transposition est un processus à la fois mutagène et générateur de remaniements génomiques profonds. Dans ces conditions, des événements de transposition itératifs, non contrôlés, auraient de graves effets délétères. D'où la nécessité d'une régulation génétique de la transposition, dont les mécanismes moléculaires varient d'un transposon à l'autre (BURRUS *et al.*, 2002).

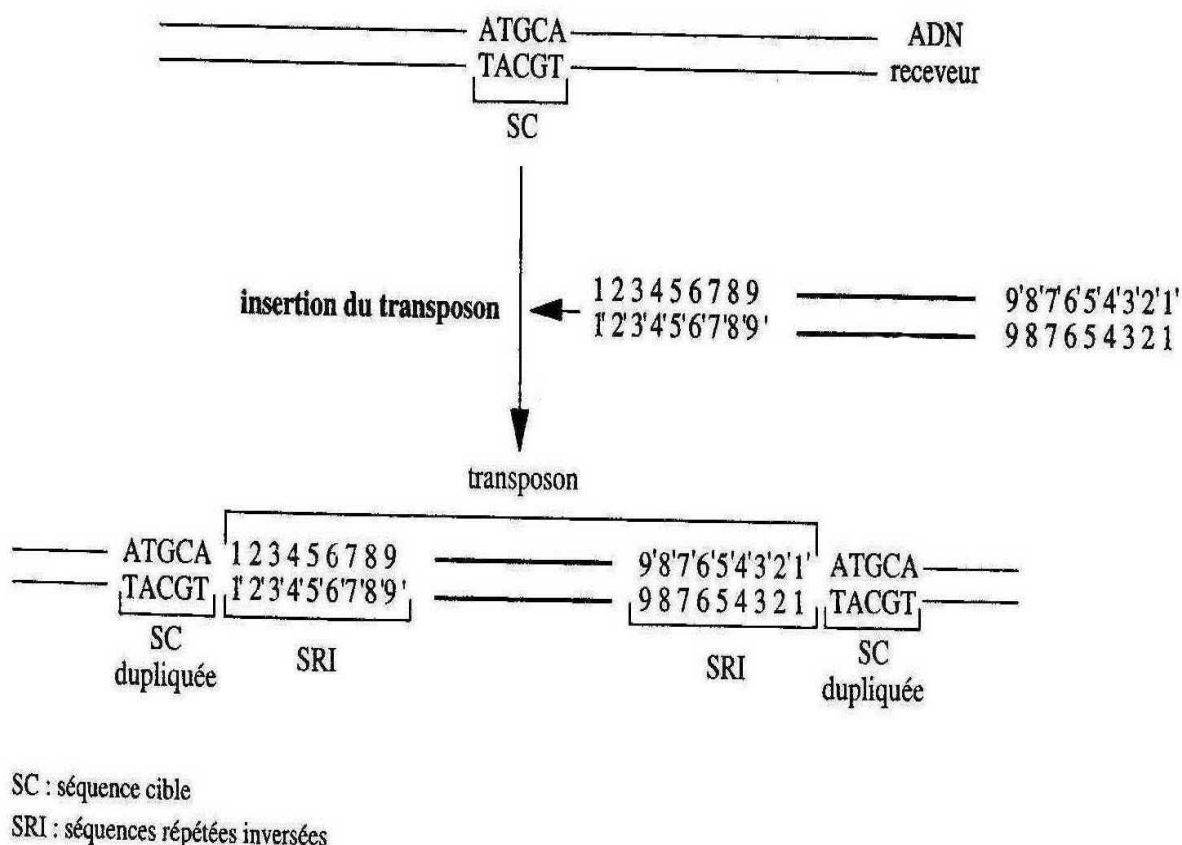
### 2-2-3-Les différents types de transposons

Les transposons peuvent être répartis en trois familles, en fonction de leur organisation globale et de leur mécanisme de transposition :

#### • Les transposons ADN

Ces transposons contiennent à la fois les séquences d'ADN qui servent de sites de recombinaison et des gènes qui codent des protéines participant à la recombinaison. Les sites de recombinaison sont aux extrémités de l'élément et sont organisés en séquences répétées inversées (SRI). Ces répétitions terminales inversées de taille variable de 25 Pb à quelques centaines de paires de bases, ne sont pas des répétitions exactes de séquences et contiennent les séquences de la reconnaissance de la recombinase. Les recombinases responsables de la transposition sont généralement appelées les transposases (ou parfois, les intégrases) (MATINCA, 2002).

Les transposons ADN contiennent un gène codant leur propre transposase. Ils peuvent contenir quelques gènes supplémentaires, codant parfois des protéines qui régulent la transposition ou qui assurent une fonction utile à l'élément ou à sa cellule hôte. Par exemple de nombreux transposons bactériens portent des gènes qui codent des protéines permettant la résistance à un ou plusieurs antibiotiques. La présence du transposon permet donc à la cellule hôte d'être résistante à ces antibiotiques. Les séquences d'ADN encadrant le transposon comportent un court segment de séquence dupliquée (2 à 20 Pb). Ces segments sont organisés en répétitions directes, ils sont appelés les duplications du site cible qui sont engendrés par le processus de recombinaison (WESSLER *et al.*, 2010). La figure 5 résume le processus de transposition.



**Figure 5** : Principe du mécanisme de transposition pour les transposons ADN. (RAISONNIER, 2007). Université Pierre et Marie CURIE.

### • Les rétrotransposons de type viral

Les rétrotransposons (et même les rétrovirus) contiennent également des répétitions terminales qui sont les sites de liaison et d'action de la recombinase. Ces répétitions terminales, à la différence de celles des transposons ADN, ne sont pas inversées, elles sont plus longues et organisées aux deux extrémités de l'élément en répétitions directes et sont appelées les longues répétitions terminales ou LTR (PEDULLA *et al.*, 2003). Les rétrotransposons de type viral codent deux protéines nécessaires à leur mobilité : une intégrase (la transposase) et une transcriptase inverse (RAISONNIER, 2007).

La transcriptase inverse ou RT (*reverse transcriptase*) est une ADN polymérase d'un type particulier, qui peut utiliser une matrice composée d'ARN pour synthétiser de l'ADN, cette enzyme est nécessaire à la transposition parce qu'un intermédiaire ARN est impliqué dans la réaction de transposition.

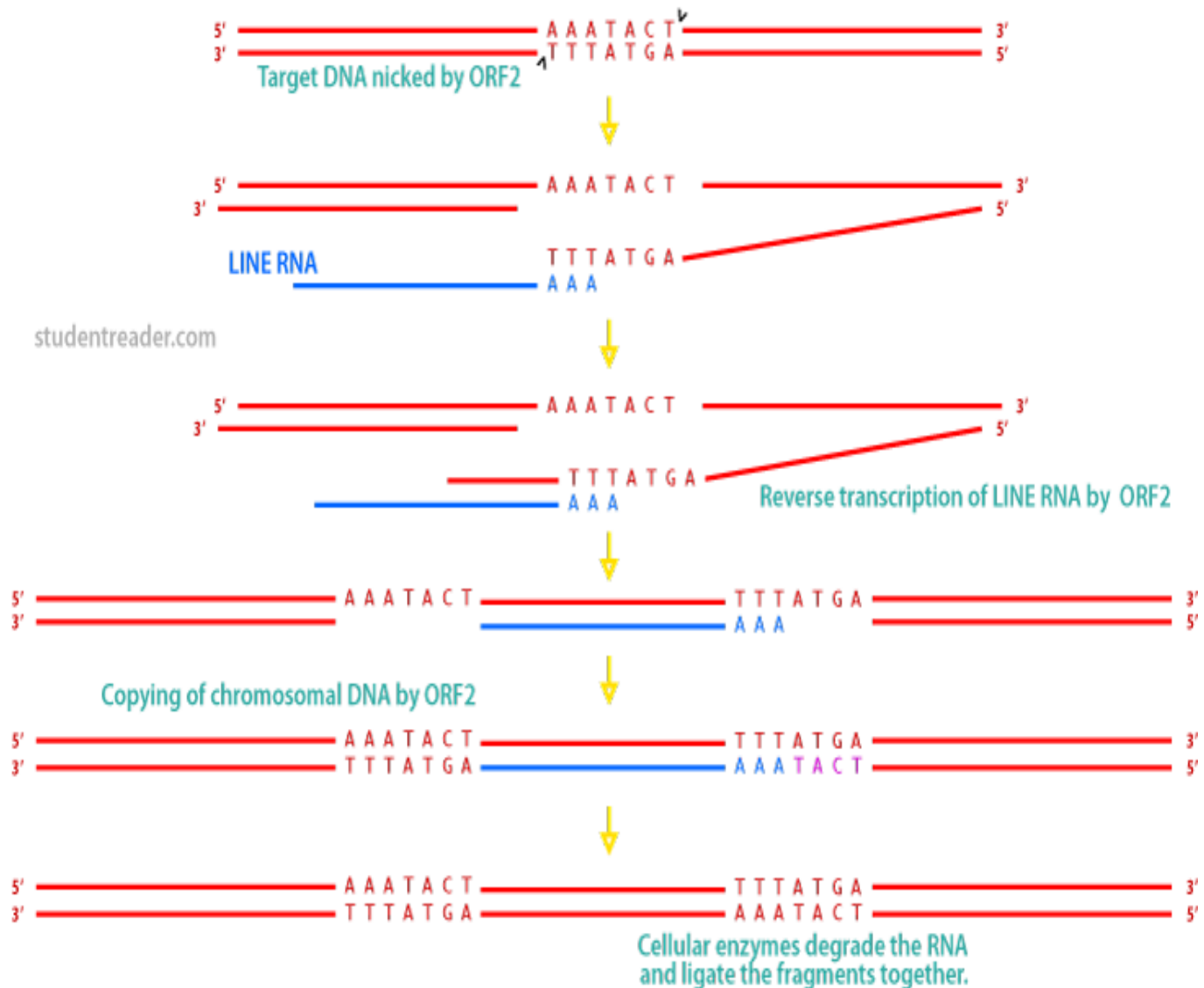
Le fait que ces éléments convertissent de l'ARN en ADN, à l'inverse du flux habituel de l'information biologique (ADN vers ARN), leur vaut le nom de *rétro* (Figure 6). La distinction entre un rétrotransposon de type viral et un rétrovirus réside dans le fait que le génome d'un rétrovirus est encapsidé dans une particule virale, s'échappe de la cellule hôte et infecte une nouvelle cellule. Au contraire, les rétrotransposons ne peuvent que se déplacer vers de nouveaux sites dans l'ADN d'une cellule (BOLTNER *et al.*, 2002).

Comme les transposons ADN, ces éléments sont encadrés par de courtes duplications du site cible, produite pendant la recombinaison (BOLTNER *et al.*, 2002).

- **les rétrotransposons poly A**

Les rétrotransposons poly A ne possèdent pas les répétitions terminales présentes chez les autres classes de transposons (HUGUES *et al.*, 2002). Au lieu de cela, les deux extrémités de l'élément présentent des séquences distinctes. Une des extrémités est appelée 5'UTR (*untranslated region*), tandis que l'autre est composée d'une région dite 3'UTR suivie d'une série de paires de bases A : T appelée séquence poly A. Ces éléments sont également encadrés par de courtes duplications des sites cible (DUFOUR *et al.*, 2000).

Les rétrotransposons poly A contiennent deux gènes, appelés *ORF1* et *ORF2*. *ORF1* code une protéine se liant à l'ARN. *ORF2* code une protéine présentant à la fois une activité transcriptase inverse et une activité endonucléase. Cette protéine, bien que distincte des transposases et des intégrases codées par les autres classes d'éléments, a des rôles essentiels pendant la recombinaison. Comme les rétrotransposons ADN et les transposons de types viral, les rétrotransposons poly A se présentent couramment dans les formes autonomes et non autonomes (WESSLER *et al.*, 2007). De plus, l'analyse de séquence met en évidence beaucoup d'éléments tronqués, qui ne possèdent pas la séquence 5'UTR complète et ont perdu leur capacité de transposition (DELAHAYE, 2009).



**Figure 6 :** Principe du mécanisme de transposition pour les rétrotransposons (RAISONNIER, 2007). Université Pierre et Marie CURIE.

#### 2-2-4-Différents éléments génétiques transposables

- **Les séquences d'insertion**

Les séquences d'insertion sont les éléments génétiques transposables les plus simples. D'une longueur d'environ 1000 Pb, elles possèdent uniquement l'information génétique nécessaire au processus de transposition, soit des séquences répétées inversées à leurs extrémités et une ou deux phases de lecture ouvertes codant pour une transposase. Des séquences d'insertion ont été mises en évidence chez de nombreuses espèces bactériennes.

Les mieux caractérisées sont celles identifiées chez *E. Coli*. Certaines séquences d'insertion sont portées uniquement par le chromosome comme les séquences IS1, IS4 et IS5. D'autres, les séquences IS2 et IS3, sont représentées à la fois sur le chromosome et le plasmide F : c'est par leur intermédiaire que s'effectuent certaines des fusions chromosome-plasmide F qui donnent naissance aux bactéries *Hfr* (DELAHAYE, 2009).

### • Les transposons composites

Ces éléments génétique transposables sont constitués d'une région centrale flanquée de séquences d'insertion appelées modules IS. Les modules IS apportent les séquences répétées inversées qui bordent le transposon et l'information génétique nécessaire à l'accomplissement du processus de transposition (DELAHAYE, 2009). La région centrale porte des marqueurs, c'est à dire des gènes qui confèrent de nouveaux caractères à la bactérie hôte. La nature de ces gènes est variable selon les transposons : il peut s'agir de gène de résistance aux antibiotiques ou aux métaux lourds, de gènes métaboliques ou de gènes de virulence et de production de bactériocines (WESSLER *et al.*, 2010).

Les locis de certains antibiotiques ont été décrits comme étant inclus dans des transposons composites. C'est le cas de la *lacticine 481* et la *lacticine 3147* qui sont encadrées par des copies de séquences d'insertion (IS), respectivement IS 1647 et IS 946 (DUFOUR *et al.*, 2000 ; GALIMAND *et al.*, 2005). Bien que seule la production de *nisine*, de la *lacticine 481* et de la *lacticine 3147* soit liée à l'existence d'un transposon, il apparaît que les IS, très fréquemment présentes dans le génome des lactocoques et parfois contiguës aux gènes des bactériocines, constituent des éléments importants dans l'échange génétique intra et interspèce chez ces bactéries (GALIMAND *et al.*, 2005).

### • Les transposons de la famille TnA

Les transposons appartenant à cette famille ont surtout été identifiés chez des bacilles à Gram négatif, entérobactéries et *Pseudomonas*, mais aussi chez des *staphylocoques* et des *entérocoques*. Ils forment un groupe homogène dont le chef de file est le transposon Tn3 (KANEKO *et al.*, 2000). Mis en évidence chez *Salmonella*, le transposon Tn3 a une taille d'environ 5Kb et confère la résistance à l'ampicilline par production de  $\beta$ -*lactamase* (WESSLER *et al.*, 2010). Il possède à ses extrémités des séquences répétées inversées de 38pb et contient trois gènes : les gènes *bla*, *tnpA* et *tnpR*. Le gène *bla* est le gène de structure de la  $\beta$ -*lactamase* responsable de l'inactivation de l'ampicilline, le produit du gène *tnpA* est une *transposase*, protéine indispensable à la réalisation des premières étapes de la transposition. Le gène *tnpR* code une protéine qui est à la fois répresseur et enzyme.

Le répresseur contrôle la transcription du gène *tnpR*, c'est à dire sa propre synthèse, et celle du gène de la *transposase*. L'enzyme appelée *résolvase*, permet l'achèvement du processus de transposition ; elle exerce son activité enzymatique sur le site *res* ou site de résolution interne qui est localisé dans la région intercistronique séparant les gènes *tnpA* et *tnpR* (WATSON *et al.*, 2009). Les autres transposons de la famille TnA ont une structure similaire à celle de Tn3. Ils diffèrent par la position relative des gènes intervenant dans les processus de la transposition et la nature des marqueurs. (WESSLER *et al.*, 2010).

La résistance à l'*erythromycine* (*Em*) et à la *vancomycine* (*Van*) a été transférée à partir de souche d'*Enterococcus faecalis* FA2-2 vers la souche *Enterococcus faecalis* NKH15 à une fréquence de 10<sup>-4</sup>, les transconjugants résistant à *Van* et à *Em* ont acquis les plasmides désignés par *pMG2200* de 106 kpb et *pMG2201* de 65,7kpb respectivement. *PMG2200* confère à la bactérie hôte la résistance à la *vancomycine* et une activité bactériocinogène, *pMG2201* confère quant à lui la résistance à l'érythromycine et la production de *cytolysine*. Le séquençage complet de l'ADN du plasmide *pMG2201* a montré que ce dernier est porteur d'un transposon *Tn1549* codant la résistance à la *Vancomycine* et la production de bactériocine. (CHEMBL, 2010).

### 2-2-5-Les principaux modes de transposition

Dans la transposition répllicative, le transposon est dupliqué au cours de la réaction. Une copie du transposon reste en place, tandis que l'autre copie s'insère dans le site receveur. Ce processus aboutit à l'intégration d'un nombre toujours plus élevé de copies du transposon au sein du génome de la bactérie hôte (cependant il faut rappeler que chaque événement de transposition est très rare). Ce mode de transposition caractérise les transposons de la famille *TnA*. Il peut également s'observer chez certaines séquences d'insertion et le phage  $\mu$  (WESSLER *et al.*, 2010).

Dans la transposition non répllicative, le site donneur ne conserve pas de copie du transposon. On assiste à une véritable opération de type couper-coller, au cours de laquelle le transposon se désinsère du site donneur et vient s'intégrer dans le site receveur (DALE, 2004). A l'issue de ce processus, l'ADN donneur peut, ou non, être endommagé. Dans le premier cas, on parle de transposition non conservative.

Ce mode concerne la plupart des séquences d'insertion, les transposons composites et le phage  $\mu$ . Dans l'autre cas, on parle de transposition conservative. Ce mode est caractéristique des transposons conjugatifs. A l'instar de certains phages, ces éléments génétiques s'insèrent et se désinsèrent d'un ADN sans, en règle générale, en modifier la séquence. On dit que leur excision est propre (ROCES *et al.*, 2009).

# Mode d'action des bactériocines

Le mode d'action des bactériocines est basé sur leur interaction avec la surface cellulaire des bactéries cibles. Les souches du genre *Listeria* constituent le meilleur modèle de souche cible. Cette bactérie est, en effet, une des cibles privilégiées des bactériocines de classe IIa (NAGHMOUCHI., 2007). Comme toutes les bactéries à Gram positif, *Listeria* possède un peptidoglycane qui forme un réseau solide et poreux à travers lequel certaines molécules peuvent diffuser. Sa paroi est aussi composée d'acides teichoïques, chargés négativement, connectés soit au peptidoglycane, soit aux lipides membranaires (dans ce cas on parle d'acides lipoteichoïques). Ce sont les lipides membranaires qui constituent l'armature de la membrane. Il s'agit de molécules amphiphiles possédant une tête polaire, une région interface et un coeur hydrophobe qui s'organisent spontanément en bicouche dans un milieu aqueux (CHATTERJEE *et al.*, 2005).

### 1-Rôle des différentes régions de la bactériocine

L'étude des relations entre structure et fonction des bactériocines 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 (Tryptophane notamment) 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.*, 2006).

Les motifs en hélice  $\alpha$  seraient indispensables à l'activité antibactérienne des bactériocines (FIMLAND *et al.*, 2002). 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 menés afin d'identifier les motifs structuraux directement impliqués dans l'activité antibactérienne de ces peptides (ASADUZZAMAN *et al.*, 2006).

#### La région N terminale

Plusieurs éléments de cette région ont été proposés comme essentiels dans l'activité de la bactériocine, notamment la séquence consensus YGNGV (voir annexe 9, tableau d'identification des acides aminés), le feuillet  $\beta$ , les charges positives et les ponts disulfure.

##### • Le motif YGNGV

Ce motif, très conservé dans toutes les bactériocines de sous classe IIa, serait intégré dans une structure en feuillet  $\beta$  (KRUIJFF, 2006). Cette séquence a été longtemps considérée comme la partie responsable de l'activité anti-*Listeria* chez les bactériocines de la sous classe IIa. En effet, toute modification ou délétion au niveau de ce motif entraînent une diminution importante voire perte totale d'activité vis-à-vis du genre *Listeria* (WIEDEMANN *et al.*, 2006). Cependant, des bactériocines appartenant à la même sous classe et présentant des altérations au niveau de cette séquence consensus comme la *piscicocine GS526* (SUZUKI *et al.*, 2005), conservent encore une activité anti-*Listeria*, ce qui remet en cause la théorie si dessus.

- **Le feuillet  $\beta$**

Deux fonctions ont été proposées pour le feuillet  $\beta$  :

La première 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 assurant l'expression de son activité (TWOMEY *et al.*, 2002). Cette séquence interviendrait dans la première étape de la fixation à la membrane en stabilisant la structure en feuillet  $\beta$  intervenant dans l'adsorption à la membrane de cellule cible (BAUER *et al.*, 2005). La structure en feuillet  $\beta$  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 (BIRRI *et al.*, 2010).

La deuxième fonction de cette structure  $\beta$  serait la formation d'un bloc hydrophobe facilitant ultérieurement l'insertion de la bactériocine au sein de la bicouche lipidique (WILLEY *et al.*, 2007).

- **Les ponts disulfures**

La présence du pont disulfure ne semble pas obligatoire pour l'activité de ces peptides biocides (SIMON *et al.*, 2002). Cependant, la disparition de ces ponts (blocage des thiols ou mutagenèse) au niveau de la *mesentericine Y105* a entraîné une perte importante de son activité (SIMON, 2002). Il est fort probable que le pont disulfure permette de conserver une structuration en feuillet  $\beta$  servant à faciliter le contact avec la membrane via des interactions électrostatiques.

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 (BHUGALOO-VIAL *et al.*, 1999). Ce pont aiderait à la stabilité de la structure en feuillet  $\beta$ , même en milieu polaire, puisque les prédictions de structure effectuées sur la *pédiocine PA-1* prévoient le même pourcentage de structure  $\beta$  dans un milieu polaire que dans un milieu apolaire (WATSON *et al.*, 2001).

Les peptides possédant un pont disulfure supplémentaire présentent une activité à spectre plus large que ceux ayant un seul pont disulfure (EIJNSINK *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). Il a été suggéré que le deuxième pont disulfure, comme celui placé dans la région Nterminale, permettrait la formation d'un bloc de charges positives favorisant l'adsorption sur les phospholipides négatifs de la membrane bactérienne (BELGUESMIA *et al.*, 2011). 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 *mesentericine 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 contrairement à la région N-terminale qui est relativement conservée (MORGAN *et al.*, 2005).

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 cellule cible. De nombreux auteurs ont émis l'hypothèse que ce serait la partie C – terminale en hélice  $\alpha$  et non la partie N-terminale et sa séquence anti-*Listeria* qui serait responsable de la spécificité de la cible (JOHNSEN *et al.*, 2004).

Une combinaison entre la région N-Terminale d'une bactériocine avec la région C-Terminale d'une autre bactériocine, a donné des molécules hybrides, avec un spectre d'activité 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* (MORGAN *et al.*, 2005).

- **L'hélice  $\alpha$**

L'hélice  $\alpha$  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 (CASTELLANO *et al.*, 2007). 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 (NISSEN-MEYER *et al.*, 2009).

- **Les acides aminés aromatiques**

Les acides aminés aromatiques, notamment le tryptophane, semblent très important 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  $\alpha$  de la région C-terminale (83% des cas) (NISSEN-MEYER *et al.*, 2009).

Pour les bactériocines qui ne présentent qu'un seul tryptophane, 50% d'entre elles possèdent 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* (FIMLAND *et al.*, 2002) ou pour la *mesentericine Y105* (WIEDEMANN *et al.*, 2006). Ces deux résidus aromatiques pénètrent dans la partie hydrophobe de la membrane lipidique lors de l'ancrage de ces deux bactériocines (CASTANO *et al.*, 2005).

Les résidus tryptophane perturberaient la membrane et permettraient ainsi l'insertion de l'hélice  $\alpha$  C-terminale. Toute substitution de l'un ou l'autre des deux résidus tryptophane de la *sakacine P*, présumés encadrer l'hélice  $\alpha$  amphiphile, provoque une perte importante d'activité. La substitution la moins délétère est celle effectuée avec la phénylalanine (FIMLAND *et al.*, 2002). 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.*, 2002).

## 2-Le spectre d'activité

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont des peptides antimicrobiens de faible poids moléculaire appartenant aux bactériocines de classe IIa. Elles ont une activité inhibitrice dirigée contre les bactéries proches de la souche productrice. Leur spectre d'action est généralement étroit. Cependant, la plupart des molécules agissent sur des pathogènes alimentaires tels que *Listeria monocytogènes*, *Bacillus sp*, *Micrococcus sp*, des espèces hautement pathogènes telles que *Staphylococcus aureus*, *Clostridium sp*, et même sur d'autres bactéries lactiques (DORTU *et* TONART, 2009). Les bactériocines des bactéries lactiques exercent leur activité létale uniquement sur les bactéries à Gram positif en provoquant ou non la lyse cellulaire. Le spectre d'activité est généralement plus large que celui des colicines produites par les souches d'*Escherichia coli* (CASCALES *et al.*, 2007) ou des microcines produites essentiellement par la famille des *Enterobacteriaceae* (DUQUESNE *et al.*, 2007).

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 classe IIa, car, sans toutefois posséder la séquence consensus YGNGV dans leur région N-terminale, certains peptides expriment de fortes activités antagonistes envers le genre *Listeria* et ont un spectre d'inhibition plus large (BOUSBIA *et al.*, 2010).

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 beaucoup d'une espèce bactérienne à l'autre et même entre souches d'une même espèce (ENNAHAR *et al.*, 2000). Il est à noter que les spectres d'inhibition des bactériocines sont le plus souvent établis de surnageant de culture 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 cela 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 (SERVIN, 2004).

### 3-Mode d'action

Il est généralement admis que les bactériocines produites par les bactéries lactiques agissent sur les cellules cibles en deux temps : Adsorption de la bactériocine sur la surface cellulaire suivie d'un effet létale (NICHOLAS *et al.*, 2005). Après leur adsorption sur les bactéries sensibles, les bactériocines comme les antibiotiques peuvent avoir trois types d'effets :

- Un effet bactériostatique c'est à dire un ralentissement ou un arrêt de la croissance, sans mortalité cellulaire. Une reprise de la croissance peut être observée dans certains cas après un certains temps de contact entre les bactéries et la bactériocine.
- Un effet bactéricide, une mort cellulaire est observée mais les bactéries gardent leur intégrité physique, car il n'y a pas de lyse.
- Un effet bactériolytique, la mort des bactéries est due principalement 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 (PENFOLD *et al.*, 2004).

#### 3-1-Mode d'action des différentes classes de bactériocines

##### 3-1-1-Mode d'action des bactériocines de classe I

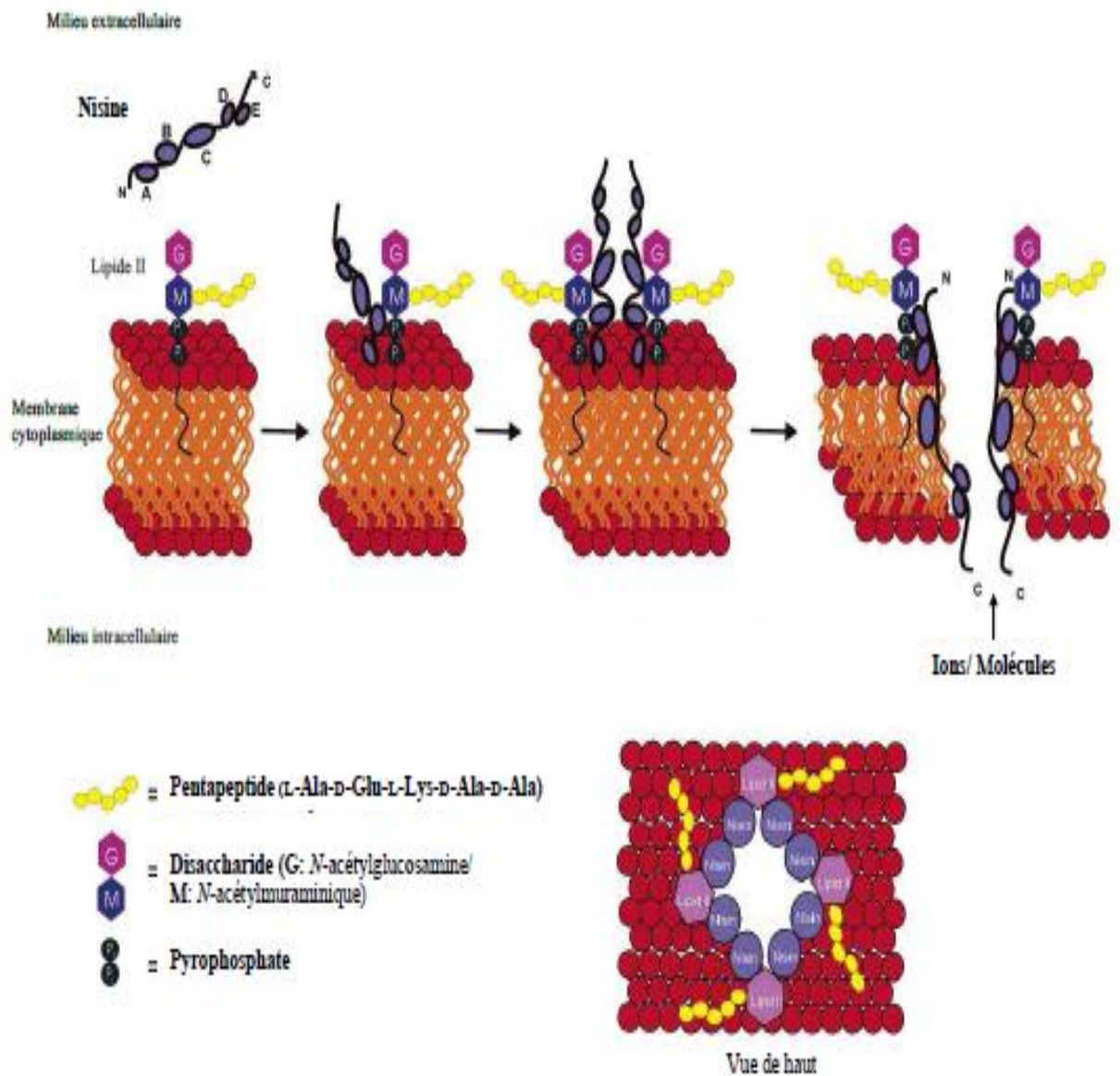
Les lantibiotiques interagissent avec la membrane cellulaire par des interactions électrostatiques ou par liaison à des récepteurs spécifiques tels que le lipide II (*Undecaprenylpyrophosphoryl-MurNAc-pentapeptides-GlcNAc*), un précurseur de peptidoglycanes. Suite à cette liaison, les lantibiotiques peuvent former des pores larges et non spécifiques dans la membrane cytoplasmique. De même, le lipide II intervient comme molécule d'amarrage lors de l'interaction *nisine*-membrane initiale, facilitant l'adoption d'une conformation adéquate de la molécule de *nisine* pour la formation des pores (HASPER *et al.*, 2006).

Ce qui va causer l'efflux rapide des petits composés cytoplasmiques tels que les ions, les acides aminés, l'ATP, etc. Cette augmentation de la perméabilité membranaire va conduire à la dissipation des deux composantes de la force proton motrice (le gradient de pH et le gradient électrochimique) et à la cessation rapide des activités cellulaires et à la mort de la cellule.

L'interaction avec le lipide II permet d'augmenter la stabilité des pores formés et de réduire la concentration du lantibiotique nécessaire à la formation des pores, mais peut également conduire à l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire (BAUER *et al.*, 2005 ; PATTON *et al.*, 2005).

Des peptides générés par mutagenèse dirigée ont permis de montrer que la capacité de la *nisine* d'inhiber la biosynthèse du peptidoglycane était indépendante de son aptitude à former des pores (WIEDEMANN *et al.*, 2001). Les lantibiotiques de type A dissipent la force proton-motrice par formation de pores et interfèrent avec la synthèse des peptidoglycanes alors que la plupart des lantibiotiques de type B agissent par inhibition de la synthèse des peptidoglycanes.

Néanmoins, certains forment également des pores dans la membrane des cellules cibles (BAUER *et al.*, 2005; PATTON *et al.*, 2005). La *nisine*, un lantibiotique de type A, interagit avec le lipide II au niveau du *MurNAc* (voire figure 7) tandis que la *mersacidine*, un lantibiotique de type B, interagit avec le *GlcNAc* du lipide II (WILLEY *et al.*, 2007).



**Figure 7** : Formation de pores membranaires par le complexe *nisine*-lipide II selon (CHATTERJEE *et al.*, 2005).

Les lantibiotiques composés de deux peptides comme la *lacticine 3147*, agissent également par formation de pores dans la membrane des cellules cibles (McAULIFFE *et al.*, 2001). La *lacticine 3147* a un spectre d'action large. Le peptide A1 a une activité qui est plus élevée en présence du peptide A2. Il a été proposé que la *lacticine 3147 A1* agit en se liant au *lipide II*, inhibant ainsi la synthèse des peptidoglycanes et permettant à la *lacticine 3147 A2* de former un pore dans la membrane de la cellule cible (MORGAN *et al.*, 2005 ; WIEDEMANN *et al.*, 2006).

### 3-1-2-Mode d'action des bactériocines de classe II

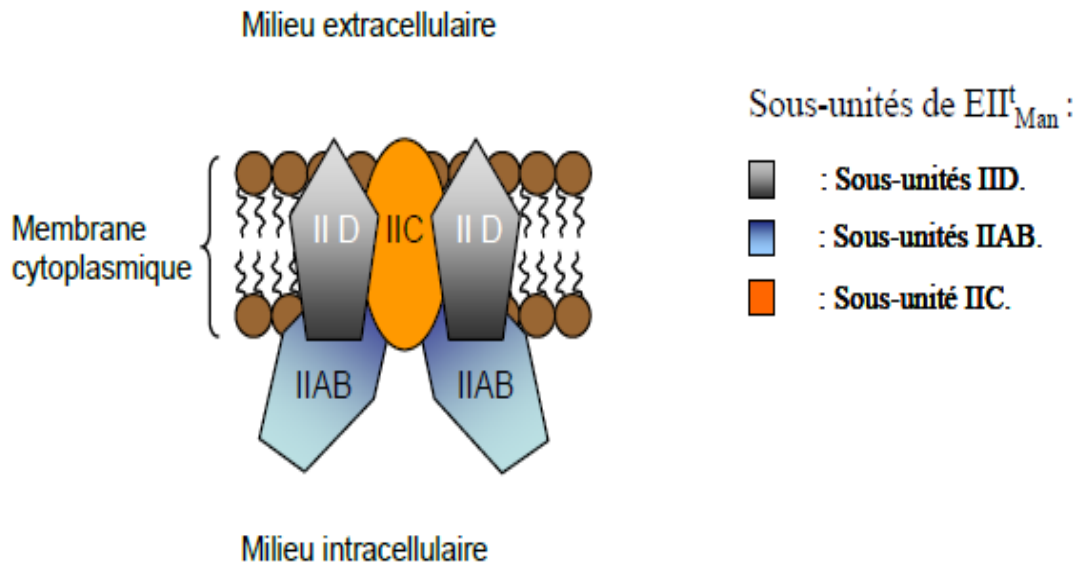
Le mécanisme d'action supposé des bactériocines de classe IIa est l'interaction de la bactériocine avec la membrane ou un récepteur spécifique, la « *mannose perméase* », pour ensuite former un pore dans la membrane de la cellule, ce qui induit la perméabilisation de la membrane, la dissipation des deux composantes de la force proton motrice et la mort de la cellule (AROUS *et al.*, 2004 ; VADYVALOO *et al.*, 2004 ; BAUER *et al.*, 2005). Le mécanisme de formation des pores n'est pas connu, même si l'hypothèse la plus courante est l'association de différentes molécules de la bactériocine (DIEP *et al.*, 2007).

Toutes les bactériocines de classe IIa présentent au moins un ou deux ponts disulfures dans leur structure. La réduction de ces liaisons thioester (les ponts disulfures) par le  $\beta$ -mercaptoéthanol diminue l'effet antimicrobien de la bactériocine. Ceci montre clairement l'importance de ces ponts pour l'activité inhibitrice. FIMLAND *et al.* (2000) ont montré par des études de mutagenèse dirigée, que le second pont disulfure (24-44) de la *pédiocine PA-1* interagissait de façon spécifique avec une cible membranaire qui facilite l'insertion de la bactériocine dans le cœur hydrophobe de la membrane, en la rendant plus perméable.

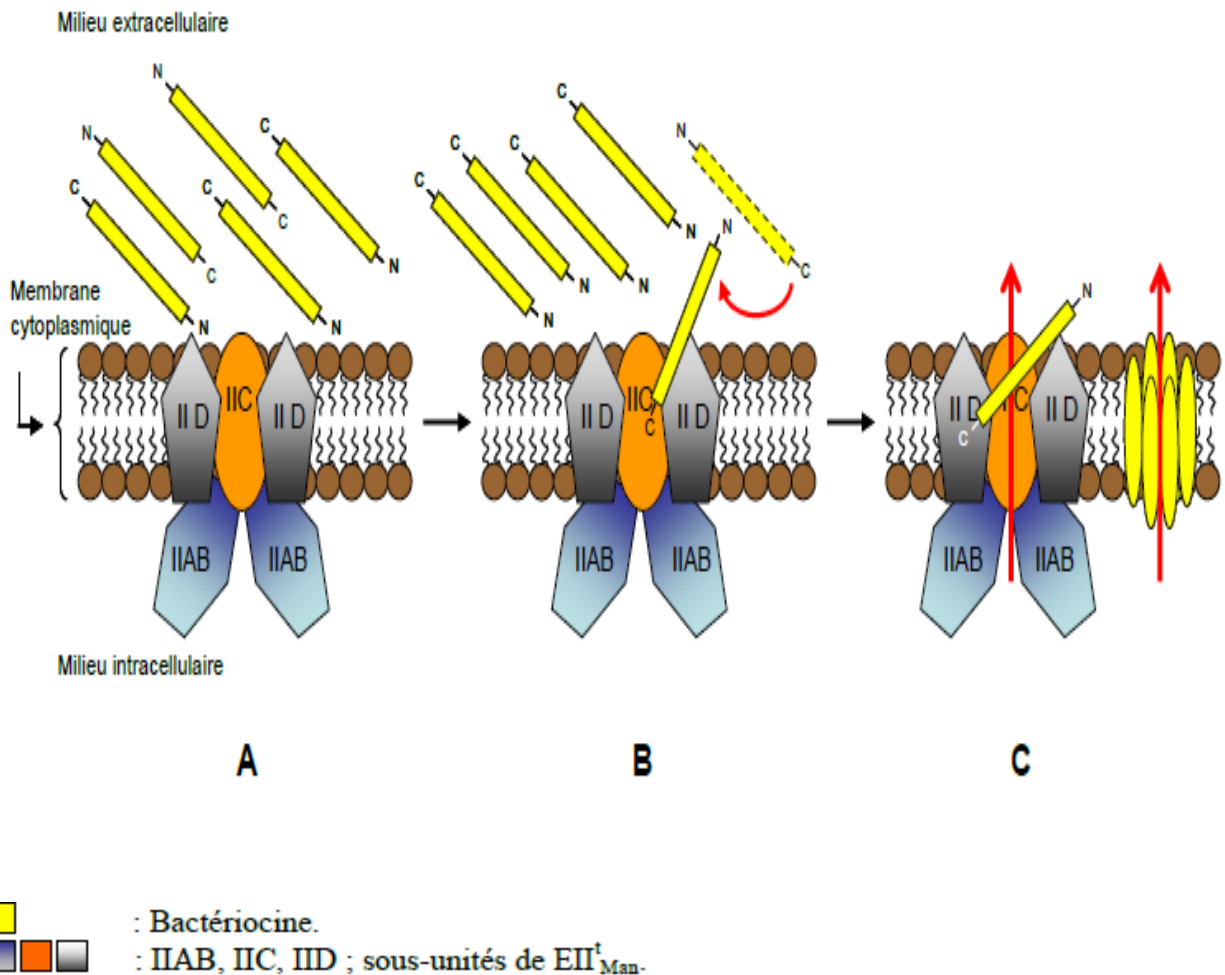
Le caractère de molécules réceptrices pourrait varier selon les bactériocines de classe IIa (EIJNSINK *et al.* 2002). Chez *L. monocytogenes*, la perméase EII<sub>t</sub> est formé d'un complexe de trois sous-unités, les sous unités IIC, IID et IIA-IIB codées par l'opéron *mpt*. HECHARD *et al.* (2001) ont montré que le niveau d'expression de l'opéron *mpt* est en corrélation direct avec le niveau de sensibilité de *L. monocytogenes*. Ces résultats suggèrent que les sous-unités IIC et IID de la perméase EII<sub>t</sub> pourraient être une cible membranaire pour les bactériocines de classe IIa (DRIDER *et al.*, 2006).

Les bactériocines de classe IIb ont en général un spectre d'action inhibant une large gamme de bactéries Gram<sup>+</sup>. Elles forment des pores et rendent la membrane perméable à différentes petites molécules, des cations monovalents ou des anions, ce qui dissipe une ou les deux composantes de la force proton motrice. Les ions transportés sont spécifiques de la bactériocine (OPPEGARD *et al.*, 2007). Le ratio optimal d'activité entre les deux sous-unités est en général de 1:1 mais il est de 4:1 pour la *lactocine 705* (CASTELLANO *et al.*, 2007 ; OPPEGARD *et al.*, 2007). Néanmoins, les mécanismes d'interaction des deux bactériocines entre elles et avec la membrane cellulaire ne sont que très peu connus. Il a été montré qu'il n'y avait pas de liaison au même récepteur que pour les bactériocines de classe IIa (la « *mannose perméase* ») (DIEP *et al.*, 2007).

EII<sub>t</sub>Man est une mannose perméase phosphotransférase impliquée dans le transport des sucres (glucose et mannose) chez les bactéries à Gram positif. Elle est formée de trois types de sous-unités dans lesquelles MptAB est une protéine localisée à la surface de la membrane cytoplasmique et MptC et MptD sont deux protéines transmembranaires (Figure 8) (DIEP *et al.*, 2007, HECHARD et SAHL, 2002). CASTELLANO *et al.* (2007) ont montré que les deux peptides composant la *lactocine 705* ont des activités bien spécifiques. La *lactocine 705 $\alpha$*  interagit avec la surface de la membrane cellulaire et la déshydrate, ce qui permet à la *lactocine 705 $\beta$*  de former des pores. Les deux figures 8 et 9 montrent respectivement la structure de la mannose perméase et le mode d'action utilisé par les bactériocines de classe IIa et par les lactococcine A et B (classe II<sub>d</sub>).



**Figure 8** : Schéma montrant la structure de la mannose perméase du système phosphotransférase (DIEP et al., 2007).



**Figure 9** : Mode d'action utilisé par les bactériocines de classe IIa et par les lactococcines A et B (classe IId) d'après Dieppe D.B. et al. (Diep et al., 2007).

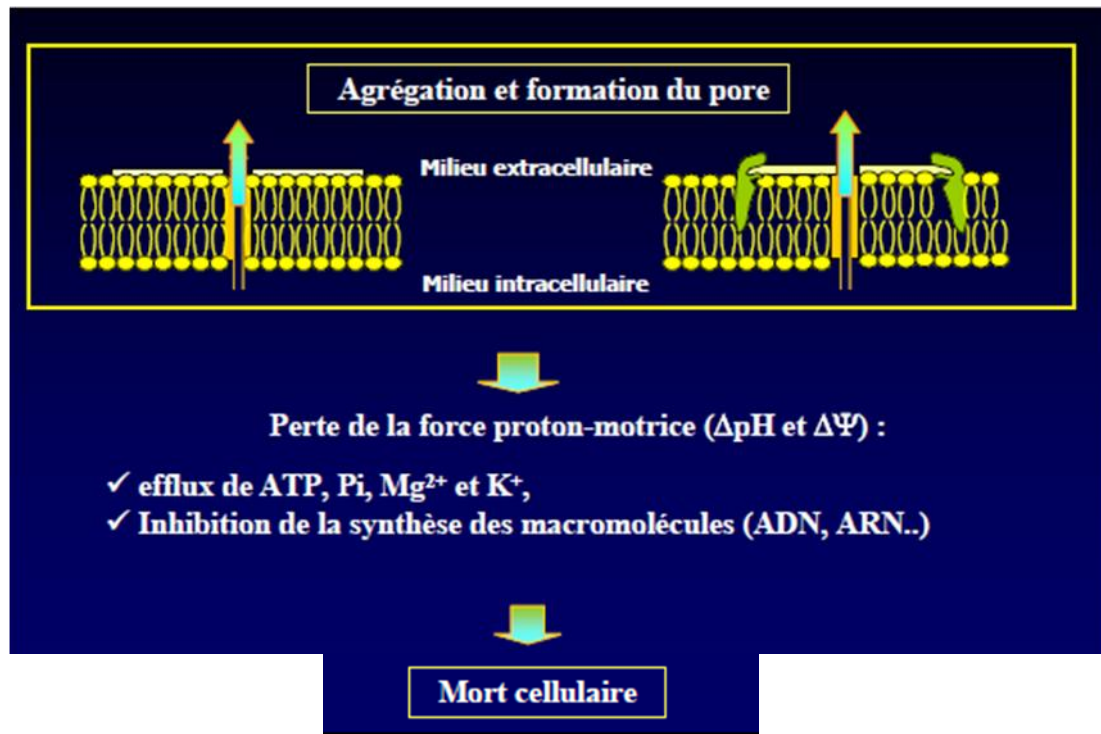
Ce modèle suggère que la bactériocine de classe IIa interagit directement avec les deux sous unités transmembranaires MptC et MptD lors du premier contact avec la membrane cytoplasmique de la bactérie cible (figure 9 A et B). L'interaction entre la bactériocine et MptC/MptD perturbera la conformation de  $EII_{tMan}$ , provoquant alors la fuite d'organites intracellulaires et la mort de la bactérie cible (figure 9 C) (DIEP *et al.*, 2007).

YAN *et al.* (2000), ont montré que l'activité de la *leucocine A* est corrélée à des interactions stéréochimiques avec une molécule cible chirale : l'énantiomère D. Il apparaît, au regard de la littérature que cette molécule,  $EII_{tMan}$  (récepteur) serait impliquée dans la voie du transport du mannose (RAMNATH *et al.*, 2002 ; HECHARD *et al.*, 2001 ; DALET *et al.*, 2001).  $EII_{tMan}$  est une perméase permettant le transport de glucose et du mannose et son expression est contrôlée par les facteurs *ManR* et  $\sigma 54$ . OSCARIZ *et al.* (2001) ont étudié le mode d'action de la *céreine 8* (bactériocine de classe IIa) produite par *Bacillus cereus* Bc7.

L'interaction de la *céreine 8* avec la membrane lipidique commence par des interactions électrostatiques non spécifiques de la partie Nterminal cationique (hydrophile) avec les charges négatives de la membrane phospholipidique. La partie C-terminal hydrophobe intervient dans la formation des pores, qui est similaire à l'action des bactériocines de classe IIa. GAUSSIÉ *et al.* (2002) ont montré que l'association entre l'interface et la membrane affecte la conformation du peptide mais ne requière pas la présence d'un récepteur.

Le mécanisme d'action de la *pédiocine PA-1* a été élucidé par spectroscopie infrarouge (GAUSSIÉ *et al.* 2002). Les résultats ont montré que la *pédiocine PA-1* n'interagit qu'avec des vésicules chargées négativement (*Dimyristoyl-phosphatidylglycérol* : *DMPG*) grâce à son extrémité N-terminale. Le peptide affecte la région interfaciale des (*Dimyristoyl-phosphatidylcholine* : *DMPG*) mais pas le coeur hydrophobe. Cette insertion à l'interface est susceptible de contribuer à la déstabilisation de la bicouche lipidique qui conduirait par la suite à la mort cellulaire GAUSSIÉ *et al.* 2002).

RAMNATH *et al.* (2004) ont montré que l'expression hétérologue de l'opéron de *mptACD* de *L. monocytogenes* chez *Lactococcus lactis* rend ces souches plus sensibles aux bactériocines de classe IIa. Les travaux de la même équipe ont montré que l'expression de la sous unité *IIC* était suffisante pour induire la sensibilité de *Lactococcus lactis* aux bactériocines de classe IIa et par conséquent proposé la sous-unité *IIC* comme molécule cible des bactériocines de classe IIa. SUZUKI *et al.* (2005) ont rapporté que la *piscicocine CS526*, une bactériocine de classe IIa, induit un efflux rapide de potassium ( $K^+$ ) à partir des cellules cibles, une réduction du niveau de l'adénosine 5'-triphosphate (ATP) intracellulaire, ce qui causera la dissipation de la force proton motrice, provoquant le mort cellulaire. Le schéma de la figure suivante résume les effets des bactériocines sur les cellules cibles.



**Figure 10:** Mode d'action des bactériocines de classe IIa (DRIDER, 2006).

### 3-1-3-Mode d'action des bactériocines de classe III

Le mode d'action de ces bactériocines diffère complètement des bactériocines des autres classes. En effet, l'*enterolysin A*, la *zoocin A* et la *millericin B* agissent par l'hydrolyse des liens peptidiques des peptidoglycanes des cellules sensibles. La *zoocin A* a un spectre d'action étroit alors que l'*enterolysin A* et la *millericin B* ont des spectres d'action large. L'*helveticin J* a un mode d'action bactéricide (NILSEN *et al.*, 2003).

### 3-2-Quantification de l'activité antibactérienne

#### 3-2-1-Détermination du titre en bactériocines

Le dosage des bactériocines présente plusieurs difficultés :

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

Cependant la méthode la plus utilisée reste celle dite des dilutions critiques (JASNIEWSKI, 2008). Celle-ci consiste à déterminer, contre une souche cible préétablie, 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, ou en gouttes à la surface (IZQUIERDO, 2009). Le titre en activité antibactérienne exprimé en UA.ml<sup>-1</sup>, 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 (mm) 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, permettant ainsi de quantifier rapidement l'activité antibactérienne d'une suspension.

La seconde méthode en milieu liquide 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 (SEBTI, 2002).

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'inhibitions obtenus en milieu gélosé est plus pratique pour doser de nombreux échantillons (DAWSON *et al.*, 2002). De plus la détermination d'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 (BURIANEK *et* YOUSEF, 2000).

### **1-3-2-2-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. 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 (MIRDAMANI *et al.*, 2008). 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 elle est passée de 15 g.l<sup>-1</sup> (VIGNOLO *et al.*, 1995) à 7 g.l<sup>-1</sup> (ARIHANA *et al.*, 1996) voire même à 6 g.l<sup>-1</sup> (COVENTRY *et al.*, 1996). La durée de diffusion à 4°C peut également jouer un rôle important, elle peut être d'une heure, de 2h, de 6h, d'une nuit, de 18h ou être nulle (GAZORI *et al.*, 2009). Le Tween 80 est aussi parfois ajouté au milieu gélosé (0,1%, v/v) pour permettre d'accroître la diffusion de l'agent antibactérien (SEBTI, 2002). Un des paramètres pouvant affecter l'efficacité des bactériocines est l'activité de l'eau (Aw). Ainsi, une Aw élevée favorise l'activité des enzymes protéolytiques mais aussi la croissance de pathogènes tel que *L. monocytogenes* (AASEN *et al.*, 2003).

Lors d'une application alimentaire, la composition du produit est un des premiers facteurs pouvant réduire ou totalement dissiper l'activité de la bactériocine de par son adsorption sur les composantes du produit, la limitation de sa solubilité et de sa diffusion, sa dégradation par des protéases, l'interaction avec des additifs alimentaires ou des ingrédients et/ou un pH inapproprié. Les traitements appliqués aux produits constituent un deuxième facteur pouvant limiter l'activité inhibitrice dans un produit alimentaire.

En effet, des traitements thermiques trop élevés peuvent dégrader les bactériocines présentes. La température de stockage pourra également réduire l'activité des bactériocines, qui varie en fonction de la température (GALVEZ *et al.*, 2007). Un autre facteur limitant l'activité des bactériocines est la flore autochtone, principalement sa concentration, la présence de bactéries résistantes, la présence de microorganismes produisant des protéases dégradant la bactériocine et l'état physiologique de cette flore. Un état physiologique stationnaire ou stressé ainsi que la formation de spores peut conduire à une résistance accrue. En outre, dans les produits solides, les bactéries forment des micro colonies ou des biofilms dont la résistance aux bactériocines peut être plus élevée (SCHÖBITZ *et al.*, 2003).

D'autre part, la combinaison des bactériocines avec d'autres traitements de conservation chimique ou physique donne des résultats prometteurs pour la conservation des aliments. Les molécules chimiques peuvent être des acides organiques, le nitrite, le chlorure de sodium, l'éthanol, des huiles essentielles (l'impact sur les propriétés organoleptiques doit être soigneusement évalué) ou des agents chélatants tel que l'EDTA, le phosphate trisodique, le citrate. Ces agents chélatants permettent de séquestrer les ions magnésium des lipopolysaccharides de la membrane externe des bactéries Gram- permettant aux bactériocines d'atteindre la membrane interne, siège de leur activité (GALVEZ *et al.*, 2007).

La conservation des aliments peut se faire par l'application des traitements physiques : la chaleur, le stockage sous atmosphère contrôlée, l'application de champs électriques ou l'application des hautes pressions (RODGERS, 2004 ; DEEGAN *et al.*, 2006 ; GALVEZ *et al.*, 2007). D'autre part, la bio-conservation par l'utilisation de bactériocines incorporées dans l'emballage associée à l'utilisation d'inhibiteurs de protéases ou de protéines de soja a été suggérée. Car plusieurs facteurs sont à considérer lors de l'application de ces biomolécules dans une matrice alimentaire : la texture du produit, sa composition, son pH ainsi que son activité de l'eau  $A_w$ , influencent la stabilité de la molécule de bactériocine et donc son activité antibactérienne, d'autre part, ces facteurs sont à considérer quant à leur effet sur la croissance et la prolifération des germes pathogènes dans le produit à conserver (KOUAKOU, 2008).

L'auto-immunité et la  
résistance aux bactériocines

## 1-L'auto-immunité

L'auto-immunité consiste en la protection de la cellule productrice de bactériocines contre la bactériocine qu'elle produit.

### 1-1- L'auto-immunité des lantibiotiques

Deux mécanismes peuvent être responsables de l'auto-immunité :

– La production d'une lipoprotéine d'immunité codée par le gène *LanI* : Cette protéine s'attache à la surface externe de la membrane et interagit avec le lantibiotique afin de l'empêcher de former des pores dans la membrane de la cellule productrice. La structure de ces protéines est très variable, ce qui permet de supposer une certaine spécificité d'interaction avec le lantibiotique (TWOMEY *et al.*, 2002 ; JOHNSEN *et al.*, 2004). Pour la nisine, il semblerait que l'extrémité C-terminal de cette lipoprotéine d'immunité soit impliquée dans l'interaction spécifique avec la bactériocine (TAKALA *et al.*, 2006).

– L'ABC transporteur codé par les gènes *LanE*, *LanF* et *LanG* : Ce système permettrait d'exporter le lantibiotique à l'extérieur de la membrane cellulaire, permettant de garder la concentration intracellulaire en dessous du seuil critique. Le mode d'action est toujours sous étude. Néanmoins, même s'il est évident que ce système permet d'augmenter l'autoimmunité, il semblerait qu'il ne soit pas suffisant pour conférer une immunité totale et doit être complété par le premier (STEIN *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2006).

### 1-2- L'auto-immunité des bactériocines de classe II

#### 1-2-1- La classe IIa

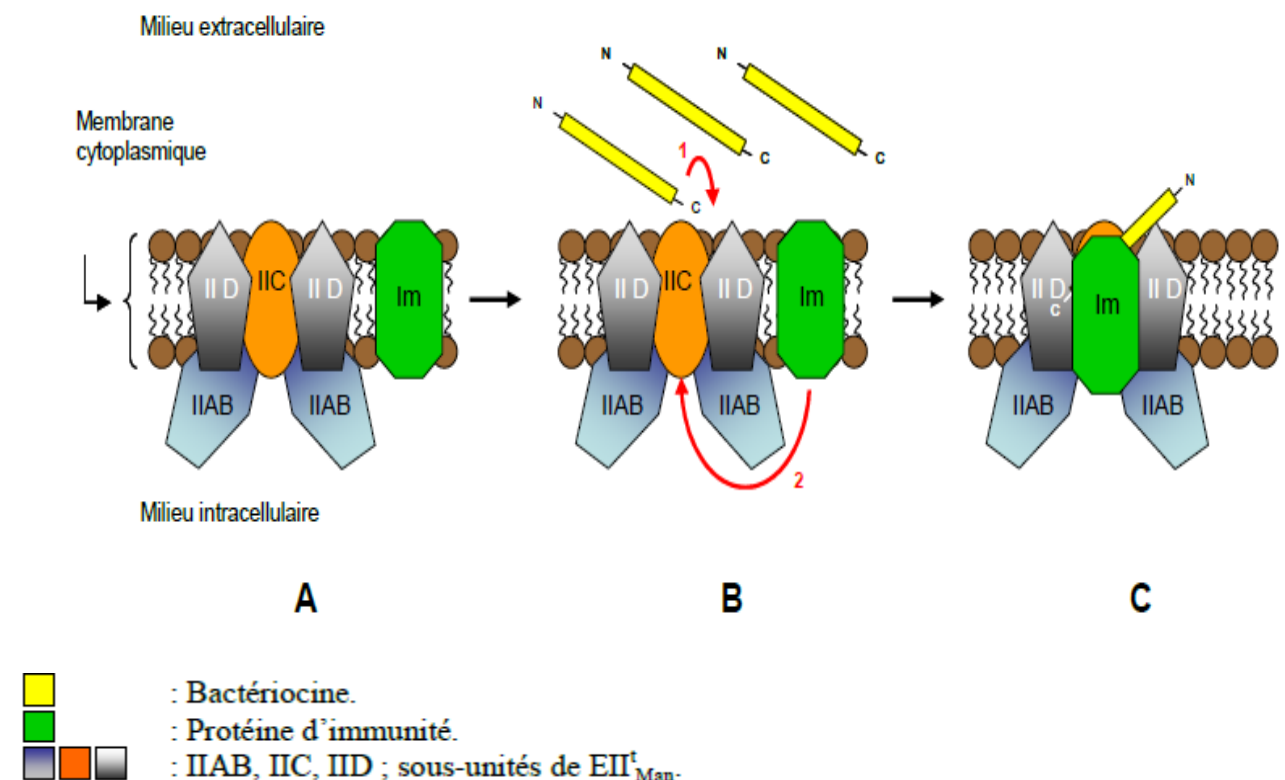
Pour les bactériocines de classe IIa, l'auto-immunité semblerait provenir de la production d'une protéine d'immunité intracellulaire contenant entre 88 et 115 acides aminés (MARTIN-VISSCHER *et al.*, 2008). Ces protéines globulaires sont cationiques et hydrophobes (MARTIN-VISSCHER *et al.*, 2008). Le gène les codant est la plupart du temps co-transcrit avec le gène de structure de la bactériocine, les deux gènes constituant un opéron.

Cependant, des gènes d'immunité indépendants ont déjà été décrits comme *orfY* qui donne une protection contre la *leucocin A* et l'*enterocin A* (FIMLAND *et al.*, 2002). Les protéines d'immunités des bactériocines de classe IIa sont classées en trois sous-groupes sur la base de leur alignement de séquence. Il y a une grande variation entre les séquences des différentes protéines d'immunité, malgré le haut degré d'homologie des bactériocines correspondantes (FIMLAND *et al.*, 2002). Les protéines d'immunité ont un haut degré de spécificité. Néanmoins, elles peuvent donner une immunité aux bactériocines contenant des séquences C-terminales homologues. Une classification des bactériocines sur la base de ces séquences a donc été réalisée.

Brièvement, le sous-groupe 1 contient l'*enterocin A*, la *pediocin PA-1*, la *sakacin P* et la *piscicolin 126* ; le sous-groupe 2 contient la *leucocin A* et la *mesentericin Y105* tandis que le sous-groupe 3 contient la *curvacin A*, la *carnobacteriocin Bm1* et l'*enterocin P* (FIMLAND *et al.*, 2002).

De plus, il semble que la séquence C-terminale des protéines d'immunité permette également de déterminer la spécificité d'action (JOHNSEN *et al.*, 2004). La fonctionnalité de la protéine d'immunité est par ailleurs dépendante de la souche (DRIDER *et al.*, 2006). Les protéines d'immunité ont une action intracellulaire. Différentes études ont pu montrer qu'elles se trouvaient principalement dans le cytoplasme et qu'elles interagissent peu avec la membrane cellulaire (JOHNSEN *et al.*, 2004). Cependant, leur mode d'action reste peu compris (ENNAHAR *et al.*, 2000 ; FIMLAND *et al.*, 2002 ; DRIDER *et al.*, 2006). DIEP *et al.* (2007) ont montré récemment que les protéines d'immunité de la *Lactococcin A* mais aussi de bactériocines de classe IIa (l'enterocin P, la sakacin A et la pediocin PA-1) agissaient en se liant à un complexe formé par les sous unités *IIC* et *IID* de la mannose transférase et la bactériocine en inhibant ainsi son action, probablement en l'empêchant de former les pores qui mènent à la mort de la cellule. En l'absence de la bactériocine dans le milieu de culture, il n'y a pas ou très peu d'interaction entre la protéine d'immunité et les sous-unités *IIC* et *IID* de la « mannose transférase ».

La bactériocine et la protéine d'immunité interagiraient mais de façon indirecte, via la  $EII_{tMan}$  (DIEP *et al.*, 2007). Une fois la bactériocine fixée à  $EII_{tMan}$ , la protéine d'immunité viendrait interagir avec le complexe  $EII_{tMan}$  / bactériocine du côté intracellulaire (Figure 11B) en empêchant ainsi la fuite d'ions et d'organites intracellulaires (DIEP *et al.*, 2007) (Figure 11C).



**Figure 11:** Modèle d'interaction de la protéine d'immunité avec la mannose perméase phosphotransférase  $EII_{tMan}$  pour les bactériocines de classe IIa et certaines bactériocines de classe IId (*Lactococcine A* et B) (DIEP *et al.*, 2007).

### 1-2-2- La classe IIb

Comme pour la classe IIa, la résistance de la cellule à la bactériocine qu'elle produit se fait par l'intermédiaire de la production d'une protéine d'immunité. Il n'y a qu'un seul gène d'immunité. L'information génétique est localisée sur le même opéron que celui des deux gènes de structure (GARNEAU *et al.*, 2002 ; OPPEGARD *et al.*, 2007).

### 2-La résistance aux bactériocines

A l'instar des antibiotiques conventionnels, certaines bactériocines sont sujettes aux mécanismes de résistance développés par les cellules bactériennes et qui tendent à réduire leur spectre d'activité. Plusieurs études rapportent un phénomène de résistance aux bactériocines de type nisine et pédiocine (ENNAHAR *et al.*, 2000 ; GRAVESEN *et al.*, 2002).

L'apparition de phénotype de résistance aux bactériocines chez des souches initialement sensibles a particulièrement attiré l'attention des chercheurs. Les phénomènes de résistance sont liés aux mécanismes d'action de ces peptides biocides dont la cible primaire est la membrane cellulaire (LIMONET *et al.*, 2002).

Le terme de résistance est délicat à définir. Il est en effet soumis 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, la température, et l'état physiologique de la souche (GALVIN *et al.*, 1999). 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 (ENNAHAR *et al.*, 2000).

Dans le cas des bactériocines de classe IIa (type pédiocine), cette résistance naturelle affecte 1 à 8% des souches sauvages des bactéries testées (Kim *et al.*, 2007) et se développe à des niveaux très élevés (DUFFES *et al.*, 2000) comparativement au mécanisme de résistance à la nisine qui évolue graduellement (GRAVESEN *et al.*, 2002).

En effet, une activité de nisinase a été observée chez plusieurs *Bacillus* spp. (SABOURANGA, 2007). *Bacillus cereus* produit une nisinase bien caractérisée qui possède une activité déhydroalanine réductase qui dégrade la nisine (SABOURANGA, 2007). Dans certains cas, la résistance aux bactériocines peut être spontanée, elle résulte de l'accoutumance des bactéries à l'agent antimicrobien comme c'est le cas pour *Lactococcus lactis* IL 1403 envers la lacticine 3147 (GUINANE *et al.*, 2006). Cependant, les souches résistantes à ces différentes bactériocines se sont montrées sensibles aux *mutacines* produites par *Streptococcus mutans* (MORENCY *et al.*, 2001).

Le développement de la résistance bactérienne aux bactériocines est un phénomène complexe dont les mécanismes ne sont pas totalement caractérisés mais qui semble incriminer plusieurs éléments. La résistance bactérienne peut survenir à la suite des altérations de la composition de la membrane cytoplasmique, des modifications en phospholipides membranaires, et des changements au niveau de la paroi cellulaire (RUSSEL et MONTOVANI, 2001 ; FABRETTI *et al.*, 2006 ;).

MC ENTIRE *et al.* (2004) ont montré que la résistance de *L. monocytogenes* à la *nisine* résulte d'une intense activité *ATPase*. D'autres études associent la résistance aux bactériocines à l'existence de plasmide.

Ainsi, TANG *et al.* (2001) ont identifié chez *L. lactis subsp. lactis* un gros plasmide *PTS50* de 47 kb qui encode la résistance à la *nisine*. CHEN *et al.* (2006) dans une étude similaire effectuée chez *L. lactis*, révèle que le gène déterminant la résistance à la *nisine* est situé sur un plasmide. Cette émergence de bactéries pathogènes résistantes à la *nisine* sème le doute quant à l'utilisation des bactériocines comme bio préservatif alimentaire. A cela, on pourrait ajouter trois facteurs limitant qui réduisent leur efficacité dans les aliments :

- Les bactériocines sont très peu actives contre les bactéries à Gram négatif, les levures et les moisissures,
- elles ne sont pas efficaces contre toutes les bactéries pathogènes à Gram positif (cellules végétatives et spores). Leur spectre d'activité varie avec la nature de la matrice alimentaire,
- il peut exister au sein des souches de bactéries à Gram positif sensibles, des mutants insensibles pouvant croître en présence de bactériocines (SABOURANGA, 2007).

Cependant, l'intérêt croissant du public pour les additifs de conservation d'origine biologique, stimule les recherches sur d'autres bactériocines plus efficaces (ENNAHAR *et al.*, 2000). Ainsi, pour contourner le phénomène de résistance aux bactériocines, on préconise dans le domaine alimentaire, l'utilisation combinée de plusieurs peptides antimicrobiens d'origine diverse et adaptés aux conditions de la matrice alimentaire. Cela crée un effet synergique d'activité contre de nombreux pathogènes alimentaires (LUDERS *et al.*, 2003).

Afin d'éliminer des bactéries indésirables dans les aliments, O'SULLIVAN *et al.* (2003) ont proposé l'introduction de bactériocine par application de cultures de cellules productrices de plusieurs bactériocines.

### **2-1-Les différents types de résistants**

Il existe pour les bactériocines trois types de résistants :

- 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 *mesentérocine 52A* (LIMONET *et al.*, 2004).
- Les résistants induits, qui sont produits lorsqu'une souche naturellement sensible à une bactériocine présente un phénotype de résistance liée à une adaptation, comme c'est probablement le cas pour *Ln. Mesenteroides subsp Mesenteroides LMA 7 AR* vis à vis de la *Mesentérocine 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 (JASNIEWSKI *et al.*, 2008). 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 (DUFFES *et al.*, 2000).
- 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 (JASNIEWSKI *et al.*, 2008).

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) (LIMONET *et al.*, 2002). La deuxième méthode repose sur une exposition unique mais à une concentration élevée en bactériocine (CRANDALL *et al.*, 1998).

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 *L. lactis* IL1403 résistants aux lantibiotiques ont été obtenus à partir d'une banque réalisée par intégration du plasmide *pORI19* (GUIANE *et al.*, 2007). Il en est de même pour *L. innocua* résistant à la *pédiocine* *AcH*. 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 de *L. monocytogenes* à la *divercine* *V41* est conservée après 20 repiquages (DUFFES *et al.*, 2000).

### 2-1-Les caractéristiques des résistants

Le support génétique de la résistance n'a pas encore été élucidé. Cependant chez *L. Monocytogenes*, trois gènes, *pbp 2229*, *hpk1021* et *Imo2487*, codant respectivement une *penicillin-binding* protéine, une histidine kinase et une protéine de fonction inconnue ont été mis en évidence (GRAVESEN *et al.*, 2004).

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 :

- La modification du peptidoglycane et la présence de cations divalents gênant la progression de la bactériocine vers la membrane cytoplasmique.
- La modification de la charge électrique de la bicouche lipidique diminuant ainsi les interactions électrostatiques entre les bactériocines et la membrane.
- La modification de la rigidité membranaire s'opposant à l'insertion des bactériocines dans la membrane.

Cependant, en 2011, MAKHLOUFI *et al.*, ont rapporté 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.

La différence de composition membranaire en acides gras, en phospholipides des résistants induits par rapport à la souche parentale a été rapportée (VADYVALOO *et al.*, 2002 ; LIMONET *et al.*, 2004; KOVACS *et al.*, 2006 ; KRAMER *et al.*, 2008). 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 de l'ARNm (KRAMER *et al.*, 2006). Ainsi chez *L. Monocytogenes* l'implication du gène *rpoN* a été observée dans le phénomène de résistance (DALET *et al.*, 2001). Ce gène code pour une protéine de 447 résidus d'acides aminés semblable à la sous unité  $\sigma_{54}$  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 *mesentéricine Y105*. De plus, lorsque le gène codant ce facteur est interrompu chez *E. Feacalis JH2-2*, la souche devient résistante à plusieurs bactériocines de la sous-classe IIa et reste sensible à la *nisine* (DALET *et al.*, 2000 ; HECHARD *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 phospho-transférase spécifique a été mentionnée (SPRULES *et al.*, 2004).

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) et qui 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 entre ces protéines et le phénotype de résistance mais une dérégulation du système d'expression du facteur sigma.

La mannose perméase interviendrait dans la résistance face à plusieurs bactériocines de la sous-classe IIa chez *L. Monocytogenes* (GRAVESEN *et al.*, 2002 ; AROUS *et al.*, 2004 ; VADYVALOO *et al.*, 2004) et chez *L. Innocua* (XUE *et al.*, 2005). Ces auteurs suggèrent que la mannose perméase est 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 $\alpha$*  résistant à la *microcine J25* qui est mutée au niveau de l'ARN polymérase, cible du peptide (YUZENKOVA *et al.*, 2002).

### **2-3-Le mécanisme de résistance des cellules cible aux bactériocines**

Etant donné qu'une des utilisations principales des bactériocines est leur application dans l'industrie alimentaire pour prévenir des contaminations par des bactéries pathogènes telles que *L. monocytogenes*, le développement de souches résistantes peut être un problème.

#### **2-3-1- La résistance aux lantibiotiques**

Le mécanisme de résistance des lantibiotiques le plus étudié est celui de la résistance à la *nisine*. Les résistances vis à vis de la *nisine* dans des souches non résistantes apparaissent à la fréquence de  $10^{-9}$  à  $10^{-2}$  pour *L. monocytogenes* et  $10^{-8}$  à  $10^{-2}$  pour les autres microorganismes après exposition à des concentrations croissantes. Leur stabilité est variable (GRAVESEN *et al.*, 2002 ; GUINANE *et al.*, 2006 ; KRAMER *et al.*, 2006 ; GUINANE *et al.*, 2007). La fréquence d'apparition des résistances varie en fonction de la souche cible et des conditions environnementales (pH, concentration en chlorure de sodium et température).

L'apparition d'une résistance est souvent associée à une diminution du taux de croissance maximale de la cellule (GRAVESEN *et al.*, 2002). Il a été montré que les mutants résistants n'avaient pas de modification au niveau du lipide II (KRAMER *et al.*, 2004). La résistance à la *nisine* a été attribuée à une différence de la composition en acide gras dans la membrane et à des modifications au niveau de la paroi cellulaire (KRAMER *et al.*, 2006; NAGHMOUCHI *et al.*, 2007). Récemment, KRAMER *et al.* (2006) ont montré que des souches de *Lactococcus lactis* résistantes à la *nisine* exprimaient différemment 93 gènes par rapport à la souche sauvage non résistante, 62 étant plus exprimés et 31 étant sous exprimés. Cette étude a permis de montrer que le mécanisme principal de résistance semblait être d'empêcher la bactériocine d'atteindre le lipide II par différents modes (KRAMER *et al.*, 2006) :

- Changer la paroi cellulaire en l'épaississant, la faisant plus dense ou en changeant sa charge,
- Elever le pH local à l'extérieur de la membrane cytoplasmique,
- Changer l'expression de l'opéron *fab* qui est impliqué dans l'élongation et la saturation des phospholipides, ce qui augmente la fluidité de la membrane et empêche la *nisine* de former des pores,
- Changer les ABC transporteurs présents. Ils peuvent être impliqués dans l'excrétion de la *nisine* hors de la membrane cytoplasmique, l'empêchant d'atteindre le lipide II.

D'autre part, il a été montré que l'adsorption de la *lacticin 3147* sur la membrane des cellules cibles était diminuée chez les mutants résistants (GUINANE *et al.*, 2006). L'apparition d'une résistance contre un antibiotique peut induire une résistance contre un autre. Par exemple, l'apparition d'une résistance contre la *lacticin 3147* induit une résistance à la *nisine* (GUINANE *et al.*, 2007).

### 2-3-2- La résistance aux bactériocines de classe IIa

Les résistances aux bactériocines de classe IIa sont souvent très élevées avec une augmentation de la CMI (concentration minimale inhibitrice) d'un facteur 1000. 1 à 8 % des souches sauvages de *L. monocytogenes* isolées sont résistantes (GRAVESEN *et al.*, 2002). Les mutations spontanées apparaissent après exposition à la bactériocine. *L. Monocytogenes* développe des résistances aux bactériocines de classe IIa à la fréquence de  $10^{-3}$  à  $10^{-6}$  (GRAVESEN *et al.*, 2004). Cette fréquence d'apparition des résistances varie en fonction de la souche, de la bactériocine et de facteurs environnementaux tels que le pH, la concentration en chlorure de sodium et la température (GRAVESEN *et al.*, 2002). La stabilité de ces mutants est variable. Par exemple, des mutants spontanés de *L. monocytogenes* 412 résistants à la pediocin PA-1 gardent cette résistance après 100 générations (GRAVESEN *et al.*, 2002).

Différents mécanismes sont à l'origine de cette résistance :

- L'augmentation du pourcentage d'acides gras insaturés dans la membrane et du nombre de chaînes courtes. Ces modifications augmentent la fluidité de la membrane en diminuant les potentialités d'insertion de la bactériocine et la formation des pores (VADYVALOO *et al.*, 2002),
- L'absence de la *mannose phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransférase* (PSTS), la molécule transmembranaire réceptrice de la bactériocine (VADYVALOO *et al.*, 2004). Il a été montré que, chez *L. monocytogenes*, l'inactivation du gène *rpoN* et de l'opéron *mpt* codant pour la mannose perméase induit la résistance de *L. monocytogenes*.

La mannose perméase est une protéine transmembranaire qui assure le transport du sucre (mannose, glucose et 2-déoxyglucose chez *L. monocytogenes*) et sa phosphorylation de part et d'autre de la membrane cellulaire. Chez *L. monocytogenes*, cette molécule contient trois sous-unités. Le gène *rpoN* code pour la sous-unité  $\sigma_{54}$  de la RNA polymérase bactérienne qui dirige l'activation de la transcription de l'opéron *mpt*.

Dans les mutants résistants, une diminution de l'expression du gène codant pour la mannose perméase et une augmentation de l'expression du gène codant pour la phosphotransférase spécifique des  $\beta$ -glucosides ont été remarquées (GRAVESEN *et al.*, 2002a; GRAVESEN *et al.*, 2002b; GRAVESEN *et al.*, 2004; VADYVALOO *et al.*, 2004).

Par ailleurs, il a été montré que des mutants résistants avaient un taux de croissance maximal réduit (GRAVESEN *et al.*, 2002). Cette réduction peut être attribuée à la diminution de la capacité à transporter des nutriments, comme le glucose, de part et d'autres de la membrane cellulaire (NAGHMOUCHI *et al.*, 2007).

### 2-3-3- Les cross-résistances

Les mécanismes de résistances aux lantibiotiques et aux bactériocines de la classe IIa ne sont pas les mêmes. Cependant, la résistance aux lantibiotiques peut parfois entraîner une résistance aux bactériocines de classe IIa ou inversement. Par exemple, NAGHMOUCHI *et al.* (2007), ont montré que la résistance de *L. monocytogenes* acquise à la *nisine A* ou *Z* augmente la résistance à la *pediocin PA-1* et à la *divergicin M35*, deux bactériocines de classe IIa. D'autre part, les mutants résistants à la *divergicin M35* montrent une résistance accrue à la *nisine Z* mais réduite à la *nisine A*. Les mutants résistants à la *pediocin PA-1*, quand à eux, ont une résistance plus élevée à la *nisine Z* et la *divergicine* mais diminuée à la *nisine A*.

Chapitre II :

Partie expérimentale

# Matériel et méthodes

## 1-Matériel

### 1-1-Matériel biologique

- Bactéries lactiques potentiellement bactériocinogènes de la collection du laboratoire de Microbiologie Appliquée (intégré à l'unité de recherche Laboratoire de Biochimie Analytique et de biotechnologies LABAB) isolées du lait de chamelle, et appartenant aux deux genres *Lactococcus* et *Lactobacillus* :

CH5: *Lactococcus lactis ssp lactis*.

CH7: *Lactococcus lactis ssp raffinolactis*.

CH8: *Lactococcus lactis ssp lactis*.

CH15: *Lactobacillus brevis/buchneri*.

- Bactérie cible: *Listeria innocua*. F Collectée et isolée à l'université de Nantes.

### 1-2-Appareillage

- Cuve verticale d'électrophorèse, plaques en verre, spacers, peigne, générateur de courant (HoferminiVe, Allemagne).
- Petite cuve verticale d'électrophorèse BIO-RAD MINI 2-D CELL. France.
- Cuve horizontale d'électrophorèse d'ADN (Bio-RAD MINI- SUB-CELL-GT). France.
- Agitateur électrique et agitateur de tube à essais.
- Agitateur magnétique à plaque chauffante (Ruhnromag, Allemagne).
- Bain marie.
- Réfrigérateur domestique.
- Congélateur à -20°C.
- pH mètre électronique.
- Plaque chauffante réglable à 95°C
- Balance électronique de précision 0,001g (KERN-EW, Allemagne).
- Centrifugeuse à 6461g.
- Centrifugeuse réfrigérée à 20 000 g (SIGMA 4-16 K, France).
- Centrifugeuse à eppendorfs de 13 000 g (SANYO Mst Micro centaur, Allemagne).
- Etuve de 37°C (memmert). Et de 30°C (BINDER, England).
- Etuve de stérilisation réglable jusqu'à 250°C.
- Autoclave (Pb international, Allemagne).
- Appareil de visualisation : chambre et détecteur à UV SERIAL N°12200230. Allemagne.
- Spectrophotomètre visible medine scientific limited WAVELENGTH. Allemagne.
- Spectrophotomètre UV-Visible UV mini-1240 UV-Vis Spectrophotometer SHIMATZU. Japon.

## 2-Méthodes

### 2-1-Revivification des germes

Les bactéries lactiques ainsi que la souche cible *Listeria innocua* F, ont été conservées à -20°C dans le bouillon M17 contenant 30% de glycérol stérile et sur milieu de conservation en piqûre centrale.

Afin de les revivifier, les bactéries lactiques sontensemencées d'abord dans 1ml de bouillon Elliker et incubées à 37°C pendant 24h. Quant à *Listeria innocua* F, elle estensemencée dans 5ml de bouillon BHIB puis incubée à 37°C pendant 24h.

### 2-2-Test d'activité par la méthode de diffusion des puits

Dans cette technique, les deux souches bactériennes (souche test et souche indicatrice) sont cultivées dans leurs conditions optimales de croissance. Afin de s'assurer du pouvoir producteur de nos souches en bactériocines après leur congélation à long terme et également de confirmer la nature protéique des bactériocines par l'étude de leur sensibilité vis-à-vis des enzymes protéolytiques. Nous nous sommes basés sur le protocole de GONZALEZ *et al* (2007) que nous avons modifié selon les moyens dont nous disposons au laboratoire. Pour se faire, les étapes ci-après ont été suivies :

#### 2-2-1- Préparation du surnageant actif

- Ensemencer la souche lactique dans 1ml de bouillon nutritif enrichi ;
- Incuber 24h à 37°C ;
- Repiquer sur 10ml par le bouillon nutritif enrichi ;
- Ajouter 2 ml d'huile de vaseline stérile pour assurer l'anaérobiose ;
- Incuber 18h à 30°C ;
- Aspirer l'huile de vaseline avec une micropipette ;
- Centrifuger à 8000g / 30min à + 4°C ;
- Neutraliser le surnageant récupéré, à pH 7 avec NaOH 1N.

#### 2-2-2- Préparation de l'inoculum de la souche indicatrice

- Réaliser une culture de *Listeria innocua* F sur 5ml de bouillon nutritif enrichi ;
- Incuber à 30°C pendant 18h ;
- Prendre 500µl à partir d'une culture Over Night de *Listeria innocua* F à 37°C ;
- Ajuster à 5ml par de l'eau physiologique (0,9% NaCl) stérile et homogénéiser (Réalisation d'une dilution 1/10 au lieu de 1/100 (modifiée en fonction des conditions pratiques).
- Inoculer 15ml de gélose nutritive enrichie (et contenant 0,9% d'agar), avec 15µl de la suspension de *Listeria innocua* F initialement préparée (DO = 0,08 correspondant à 10<sup>6</sup>UFT/ml à 625nm) ;
- Homogénéiser la gélose ;
- Couler sur boîte de Pétri et laisser un moment sur la paillasse pour solidification ;
- Réaliser des puits de 6mm de diamètre dans la gélose avec le bout circulaire ouvert d'une pipette pasteur ou d'une cloche de Durham, stérile.

**Remarque :** dans notre cas, la DO = 0,08 est obtenu par dilution de la suspension de la souche cible à 1/10 au lieu de 1/100 utilisé dans le protocole de Nantes, cela est dû, à la faible

densité microbienne que nous avons obtenu justifiée par le manque de milieu de culture (substitution du milieu ELLIKER par le bouillon nutritif enrichi).

### 2-2-3- Réalisation du test

- Charger les puits avec 70 $\mu$ l du surnageant neutralisé ;
- Laisser diffuser sur la paillasse durant 1h ;
- Incuber 16h à 30°C ;
- Deux puits ont été réalisés par boîte, le premier contenant de l'eau distillée stérile (témoin négatif), le deuxième renfermant le surnageant de la souche lactique.

La lecture se fait par la mesure du diamètre en mm avec pied à coulisse, des zones d'inhibitions formées autour des puits (Zi).

Un résultat est considéré positif si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 2mm (YILDIRIM. Z et YILDIRIM. M, 2001). La détermination du diamètre d'inhibition se fait par la formule suivante :

$Z_i = \text{diamètre de la zone d'inhibition obtenue} - \text{diamètre du puits (6mm)}$ .

### 2-2-4-Confirmation de la nature protéique des bactériocines

On utilise deux enzymes protéolytiques à concentration finale d'enzyme de 1mg/ml respectivement de Trypsine et de Pepsine. Cette étape nous donnera une idée sur les séquences en AA des peptides bioactifs, car les deux enzymes protéolytiques utilisées ont des sites de coupures différents. La trypsine coupe à la droite des acides aminés basiques et la pepsine, à gauche des acides aminés neutres.

**Préparation des enzymes** (BENKERROUM *et al.*, 2000 ; CHEN et HOOVER, 2003).

#### -Trypsine

- Préparer le tampon phosphate (0,1M, pH 6) ;
- peser 20mg d'enzyme avec une balance de précision ;
- dissoudre l'enzyme dans 10ml du tampon phosphate ;
- filtrer avec un filtre de 0,22 $\mu$ m (stérilisation);
- conserver à + 4°C.

#### -Pepsine

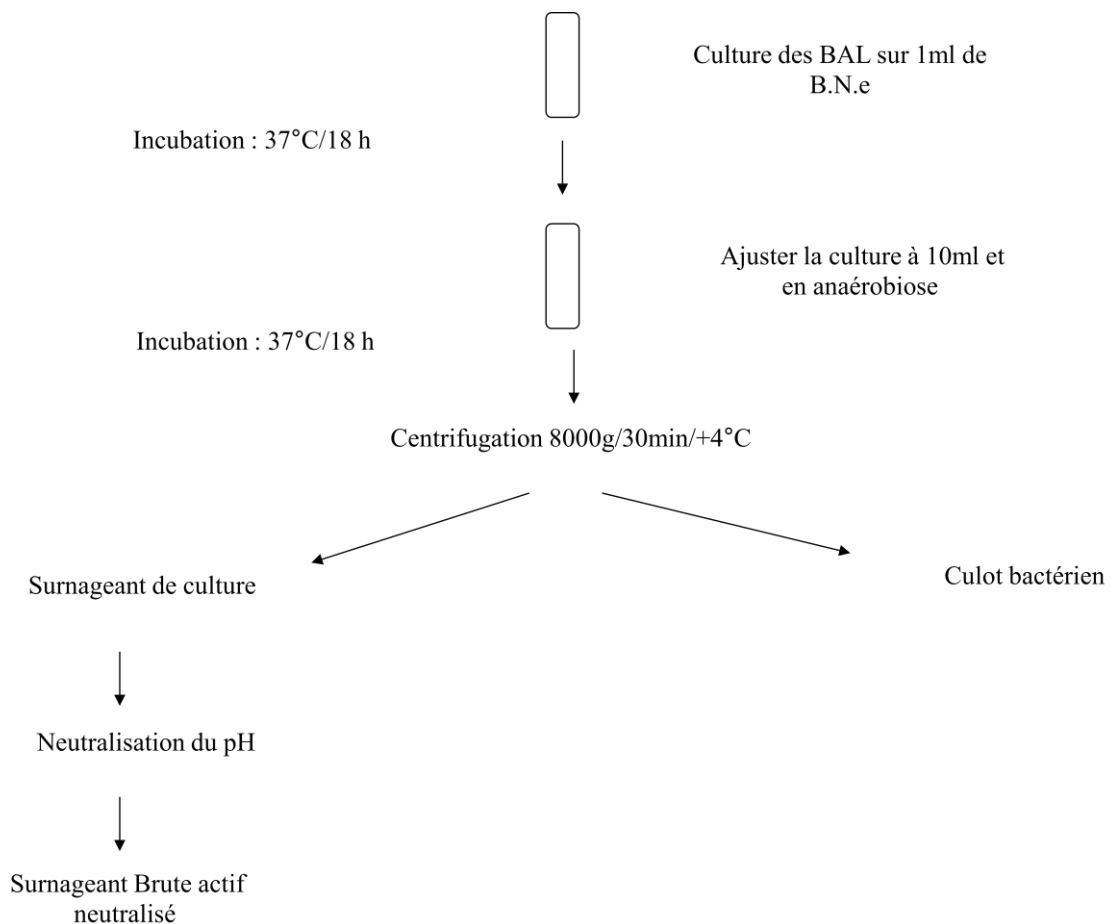
- Préparer une solution d'HCl (0,02M, pH 2) ;
- peser 20mg d'enzyme avec une balance de précision ;
- dissoudre l'enzyme dans 10ml de la solution d'HCl préalablement préparée ;
- filtrer avec un filtre de 0,22 $\mu$ m ;
- conserver à +4°C.

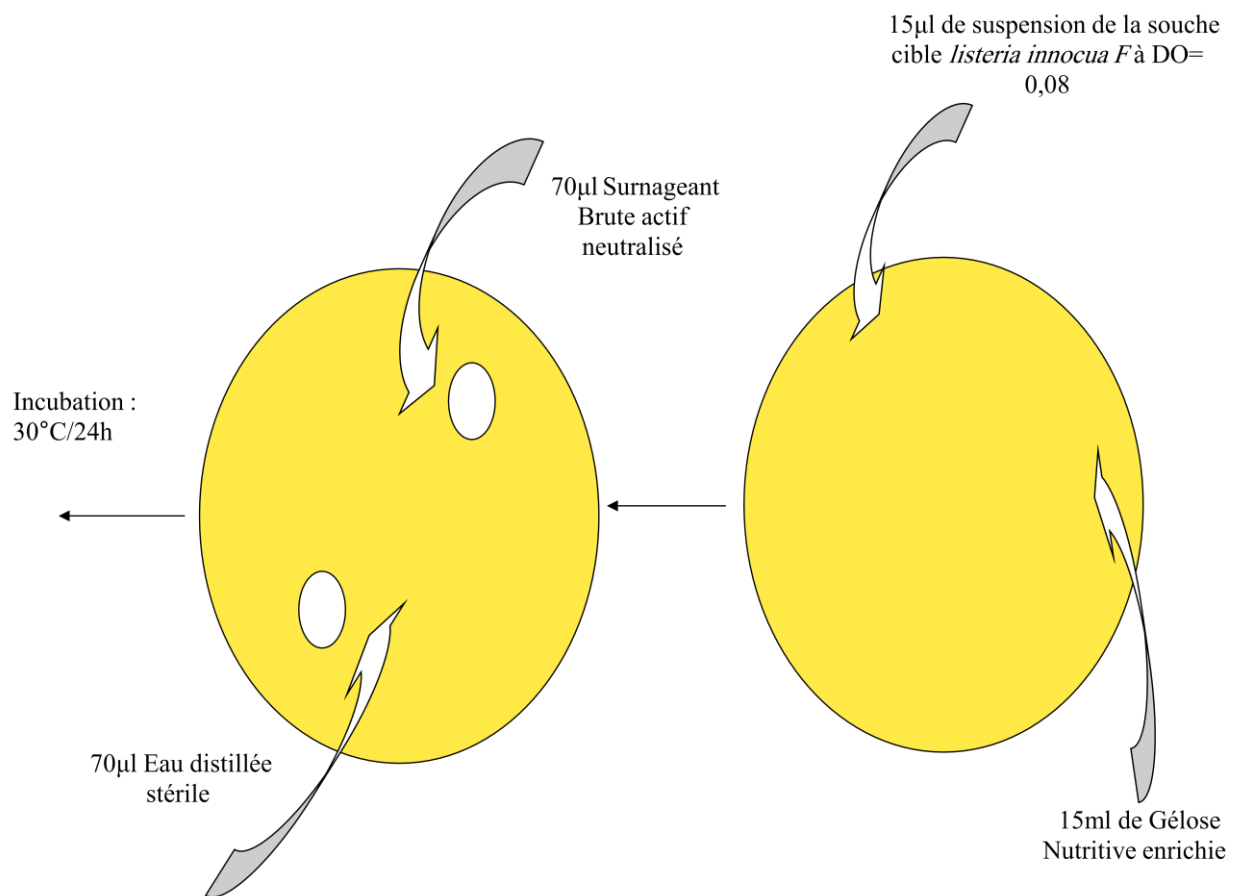
### Technique

- Mélanger 1ml du surnageant neutralisé à pH 7 avec 1 ml de la solution enzymatique (Rapport volumique 1:1) pour avoir une concentration finale en enzymes de 1mg/ml ;
- incuber 2h à 37°C dans un bain marie ; afin de permettre le contact avec l'enzyme et assurer ainsi la réaction bactériocine-enzyme ;
- charger les puits avec 70µl des solutions suivantes : tampon avec enzyme, surnageant sans enzyme et surnageant avec enzyme ;
- laisser diffuser 1h à la paillasse ;
- incuber 16h à 30°C.

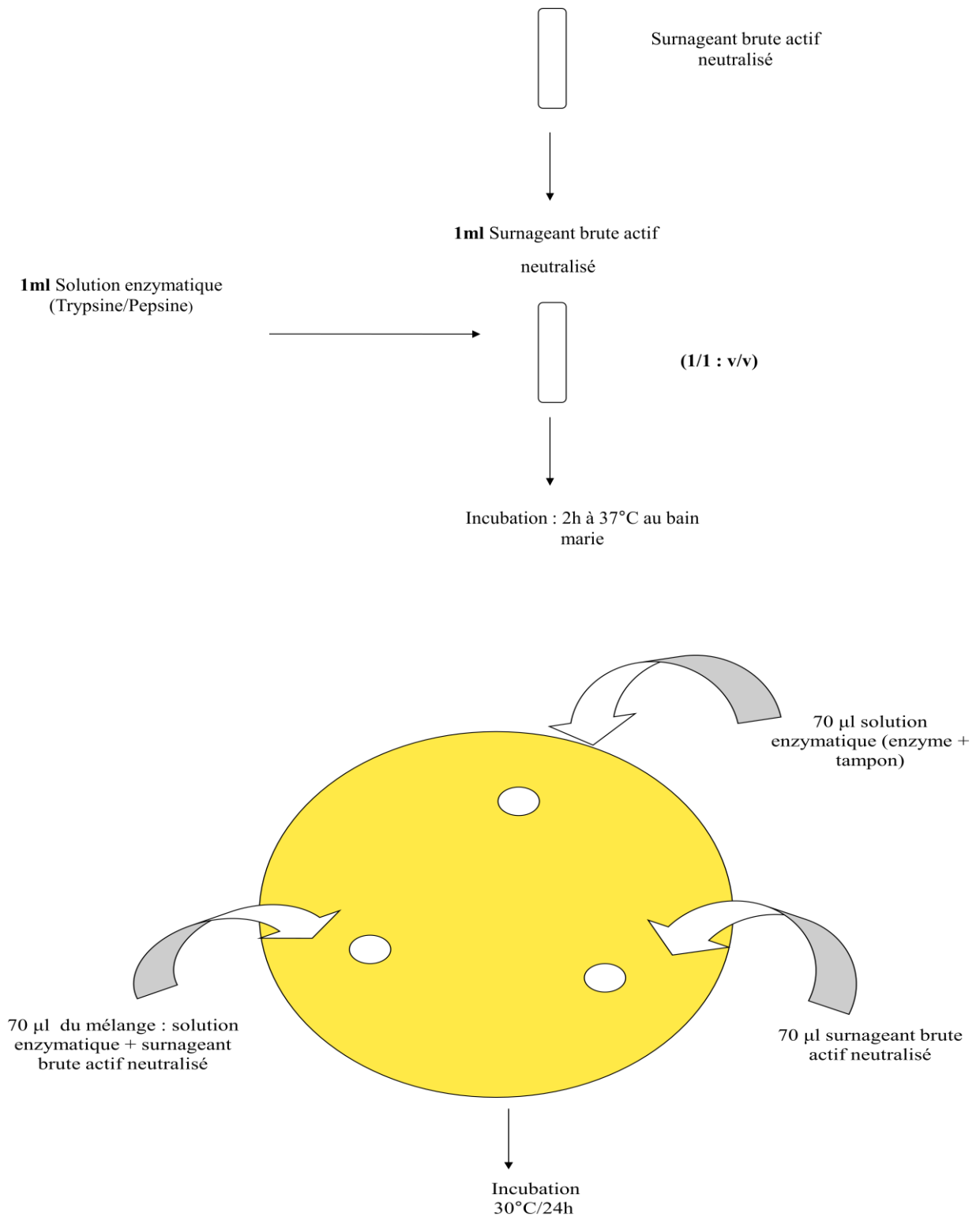
La lecture se fait par la recherche des zones d'inhibitions et la mesure de leurs diamètres.

Le schéma de la figure suivante résume les étapes suivies dans ce protocole :





**Figure 12** : schéma résumant le protocole du test de diffusion des puits.



**Figure 13** : schéma résumant le protocole d'inactivation aux protéases.

## 2-3-Purification des bactériocines

L'objectif de cette partie est d'obtenir les PM des bactériocines produites par les souches étudiées. Nous avons procédé à leur séparation par une PAGE-SDS, puis vérifié l'activité antibactérienne des bandes migrées par leur expression par la technique du zymogramme (SCHAGGER et VON JACOW, 1987).

### 2-3-1-Ensemencement des bactéries lactiques productrices de bactériocines

Les souches lactiques revivifiées sont repiquées dans 10ml de bouillon Elliker. Au bout de 24h d'incubation à 37°C, selon le protocole de NISSEN-MEYER *et al* (1992) et afin d'avoir une grande productibilité en bactériocines, une grande culture a été effectuée dans 100ml de bouillon Elliker à raison de 10% de la culture précédente. Cette culture est incubée à 37°C pendant 18h.

Au total, 4 souches lactiques sont ensemencées :

- Trois souches du genre *Lactococcus* : *Lactococcus lactis ssp lactis* CH05, *Lactococcus lactis ssp raffinolactis* CH07, *Lactococcus lactis ssp lactis* CH08.
- Une souche de *lactobacillus* : *lactobacillus brevis/buchnerii* CH15.

### 2-3-2-Séparation des bactériocines par Electrophorèse PAGE-SDS

Après 16h d'incubation correspondant à la phase exponentielle de la croissance bactérienne (ACHEMCHAM *et al.*, 2004), le bouillon Elliker troublé, de 100ml, est neutralisé, dans des conditions stériles, à pH 6,5 (pH optimal pour l'adsorption des molécules de bactériocines sur les membranes des bactéries productrices selon (YANG *et al.*, 1992), puis remis à l'incubation sous 37°C pendant 2h.

Après ces 2h d'incubation, une centrifugation a été réalisée à 6461g pendant 30mn. Le culot récupéré, est solubilisé dans 4ml d'une solution d'eau distillée ajustée à pH 1,4 par du HCl 32%. Cette acidité a pour rôle de faire désorber les bactériocines fixées sur les parois bactériennes (YANG *et al.*, 1992). En comparaison avec les techniques classiques de purification des protéines, cette méthode d'adsorption-désorption semble être plus économique, plus rapide et reproductible (PIARD *et al.*, 1992).

Ensuite, après ajout de 500 µl de Tween 80 qui est un surfactant influençant la désorption (BROWER et DAESCHEL, 1995), le mélange obtenu a subi une deuxième centrifugation à 6461g pendant 30 min, permettant de récupérer le surnageant contenant les bactériocines désorbées. Enfin, les surnageants récupérés des différentes cultures des souches étudiées, sont répartis dans des tubes à eppendorfs et mélangés avec la solution de dénaturation. (Voire Annexe 5).

Les tubes eppendorfs sont mis sur une plaque chauffante pendant 5mn sous 95°C pour assurer la dénaturation des protéines au contact avec la solution dénaturante, avant d'être, en dernier lieu, soumis à une migration en cuve verticale par une électrophorèse PAGE-SDS (LACHANCE, 2000).

La séparation se fait dans une plaque contenant trois gels, un stacking gel à 6%, un gel spacer de 10% et le separating gel de 15% en polyacrylamide, déposés l'un après l'autre respectivement.

Chaque échantillon a été chargé sur le gel en duplicata de façon à pouvoir couper le gel en deux à la fin de la migration et ainsi obtenir deux gels identiques (voir annexe 6). La plaque contenant l'ensemble gel et échantillons est ensuite plongée dans le tampon d'électrophorèse 1X, puis la migration est lancée sous les paramètres 250V et 20mA.

Un marqueur de taille PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas LIFE SCIENCE) est utilisé, couvrant la gamme de PM suivante : 250 KDa, 130 KDa, 95 KDa, 72 KDa, 55 KDa, 36 KDa, 28 KDa, 17 KDa et 10 KDa.

A la fin de la migration, le gel est découpé en deux parties, la première destinée à la coloration des bandes protéiques est traitée comme suit :

- 1h de fixation ;
- 1h de coloration au bleu de Coomassie G250 ;
- 1 h de décoloration ;

L'autre est destinée à la technique du zymogramme.

### **2-3-3-Expression de l'activité antimicrobienne par la technique du zymogramme**

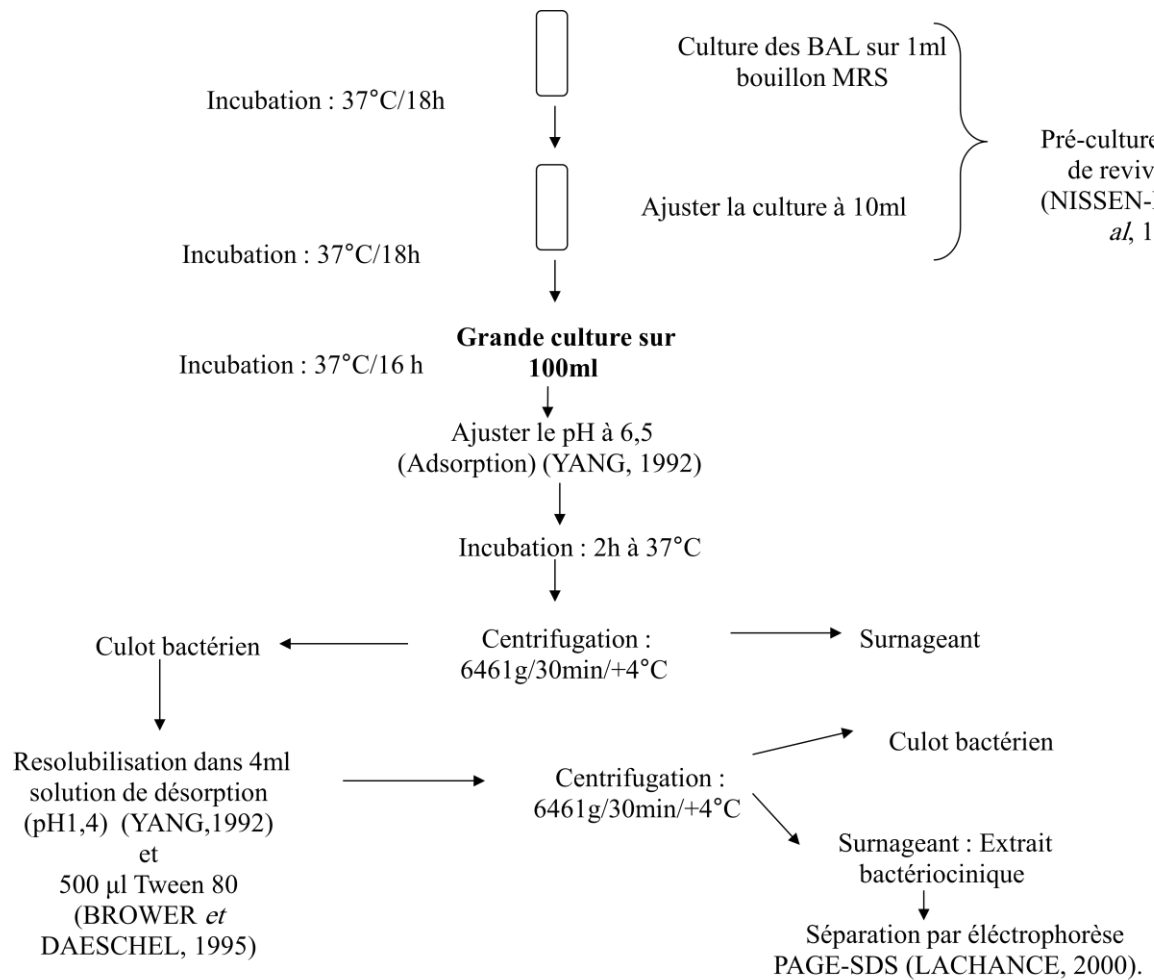
La partie du gel destinée au zymogramme est mise :

- 1h avec agitation douce dans une solution à 20 % d'isopropanol et 10% d'acide acétique ;
- 1h avec agitation douce dans une solution d'H<sub>2</sub>O distillée à 0.5% de tween 20 (v/v) ;
- 1 nuit avec agitation douce dans de l'eau distillée ;

Viennent, ensuite, les étapes suivantes :

- Rincer le gel avec de l'eau distillée filtrée (0.2 µm) puis le déposer bien à plat dans une boîte de pétri sous hotte ;
- inonder le gel avec 20 ml de milieu de culture soft agar (0.8% agarose) contenant la bactérie indicatrice à raison de 10<sup>6</sup> cellules/ml, en évitant la formation de bulle à l'aide de la pointe d'un cône en verre stérile ;
- laisser prendre en masse sous la hotte ;
- incuber selon les conditions optimales de croissance de la bactérie indicatrice.

Après incubation, la lecture se fera en localisant une zone d'inhibition de la souche cible étalée sur ce gel, puis la superposer sur le gel coloré afin de situer la bande protéique qui lui correspond et trouver ainsi le PM de la bactériocine.



**Figure 14** : schéma résumant le protocole de purification des bactériocines.

## 2-4- Caractérisation génétique des bactériocines par la méthode de la cure plasmidique

Les bactériocines sont codées par des clusters génétiques portés soit par le chromosome bactérien, soit par les plasmides, afin de localiser cet emplacement génétique, il convient d'isoler, à partir des souches étudiées, des mutants Bac – non producteurs de bactériocines. La cure des plasmides est l'une des techniques utilisées pour l'identification génétique de ces molécules (BELKADI, 2010).

Après ensemencement des souches bactériocinogènes en présence de l'agent curant, (Rifampicine ou Novobiocine), les mutants Bac – sont isolés, leurs profils plasmidiques sont déterminés par l'extraction et la migration électrophorétique de l'ADN plasmidique, puis leurs activités inhibitrices vis à vis de la souche cible *Listeria innocua F* sont testées par les deux méthodes réalisées dans les étapes précédentes, à savoir, le test d'inhibition par la méthode de diffusion des puits, et la technique du zymogramme.

Dans cette étape, seules les deux souches potentiellement bactériocinogènes : CH05 et CH07 ont été utilisées.

### 2-4-1-Cure des plasmides

#### Principes

Cette expérience a pour but de :

-Provoquer la perte d'un plasmide codant aux bactériocines par culture de la souche productrice en présence d'un agent curant utilisé à une concentration sub-inhibitrice (proche de la CMI). Les agents curant empêchent par différents mécanismes la réplication de l'ADN (bromure d'éthidium, acridine orange, U.V., antibiotiques...). Les agents curant choisis sont : la Rifampicine et la Novobiocine.

La rifampicine est un antibiotique bactéricide de la famille des rifamycines, il inhibe l'ARN polymérase bactérienne, arrêtant ainsi la synthèse du brin avancé de la réplication de l'ADN et celle de l'ARNm dans la synthèse des protéines (GRISEMINE, 2002).

La novobiocine est un antibiotique bactéricide de la famille des quinolones qui agit sur l'ADN gyrase, une enzyme de la classe des topo-isomérases de type II dont le rôle est de contrôler la structure topologique de l'ADN en générant des coupures transitoires dans celui-ci et en catalysant le passage des segments d'ADN à travers ces coupures avant de les refermer, ces mécanismes ont pour but, la stabilisation de la double hélice d'ADN par sa condensation ainsi que son déroulement (relâchement) pour faciliter le processus de la réplication (GRIFFITHS *et al*, 2002). Ces enzymes permettent notamment d'ajouter et d'enlever des super-tours dans les molécules d'ADN. Elles jouent un rôle essentiel lors de nombreuses étapes de la vie cellulaire (réplication, transcription, séparation des chromosomes, etc.). L'ADN-gyrase produit une série de coupures et de ligations des brins d'ADN ce qui permet le relâchement de la molécule puis son enroulement. Au moment de la coupure, l'ADN et la gyrase sont transitoirement liés de manière covalente.

La novobiocine agit sur ce complexe transitoire en formant un complexe irréversible ADN-gyrase-novobiocine. La soudure des brins est spécifiquement inhibée par l'antibiotique et l'ADN bactérien se trouve sous forme de fragments (EUZEBY, 2010).

La novobiocine cible l'ADN gyrase bactérienne, ce qui inhibe cette dernière tout en empêchant la réplication de l'ADN chromosomique et donc la multiplication bactérienne (KARP, 2004). A des concentrations sub-inhibitrices, ces antibiotiques exercent leurs actions sur l'ADN plasmidique sans affecter le chromosome bactérien (GRISEMINE, 2002).

## Protocoles

### Cure des plasmides par la rifampicine

(Protocole modifié de l'université de TOURS (France) ([microbiologie.univtours.fr/tp\\_m1\\_UE7\\_5a](http://microbiologie.univtours.fr/tp_m1_UE7_5a)). Unité d'enseignement de chimiothérapies anti-infectieuses UE-S7- 5a, 2006 : application à la caractérisation génétique des bactériocines).

Les souches lactiques sont cultivées en présence de l'agent curant afin de déterminer la CMI à la rifampicine en milieu liquide. Ceci permettra de choisir le tube renfermant la concentration sub-inhibitrice la plus proche.

- Gamme de demi-dilution de la rifampicine 10x dans l'eau (600 à 18.75 µg/ml) :

- A partir d'une solution mère de rifampicine à 1g/L, préparer :
  - 1 ml de rifampicine à 600 µg/ml
  - 1 ml de rifampicine à 400 µg/ml

Mettre 0,5 ml d'eau distillée stérile, dans 9 tubes à essais stériles, numérotés 300, 200, 150, 100, 75, 50, 37.5, 25 et 18.75.

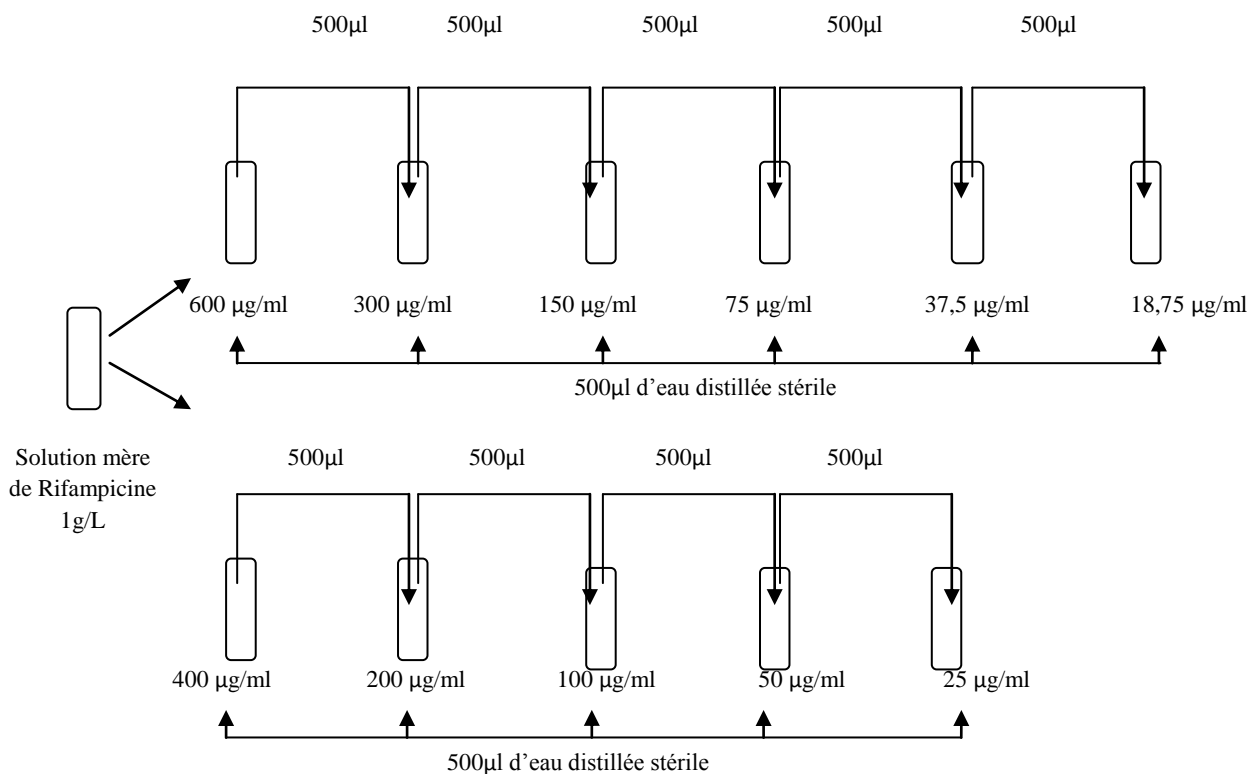
Diluer, avec des séries de demi-dilutions, les tubes 600 µg/ml et 400 µg/ml, sans changer de cône de pipette:

Tube 600 ==> 300 ==> 150 ==> 75 ==> 37.5 ==> 18.75.

(Ex. 0,5 ml d'eau + 0,5 ml rifampicine 600 = 1 ml rifampicine 300.....)

Tube 400 ==> 200 ==> 100 ==> 50 ==> 25.

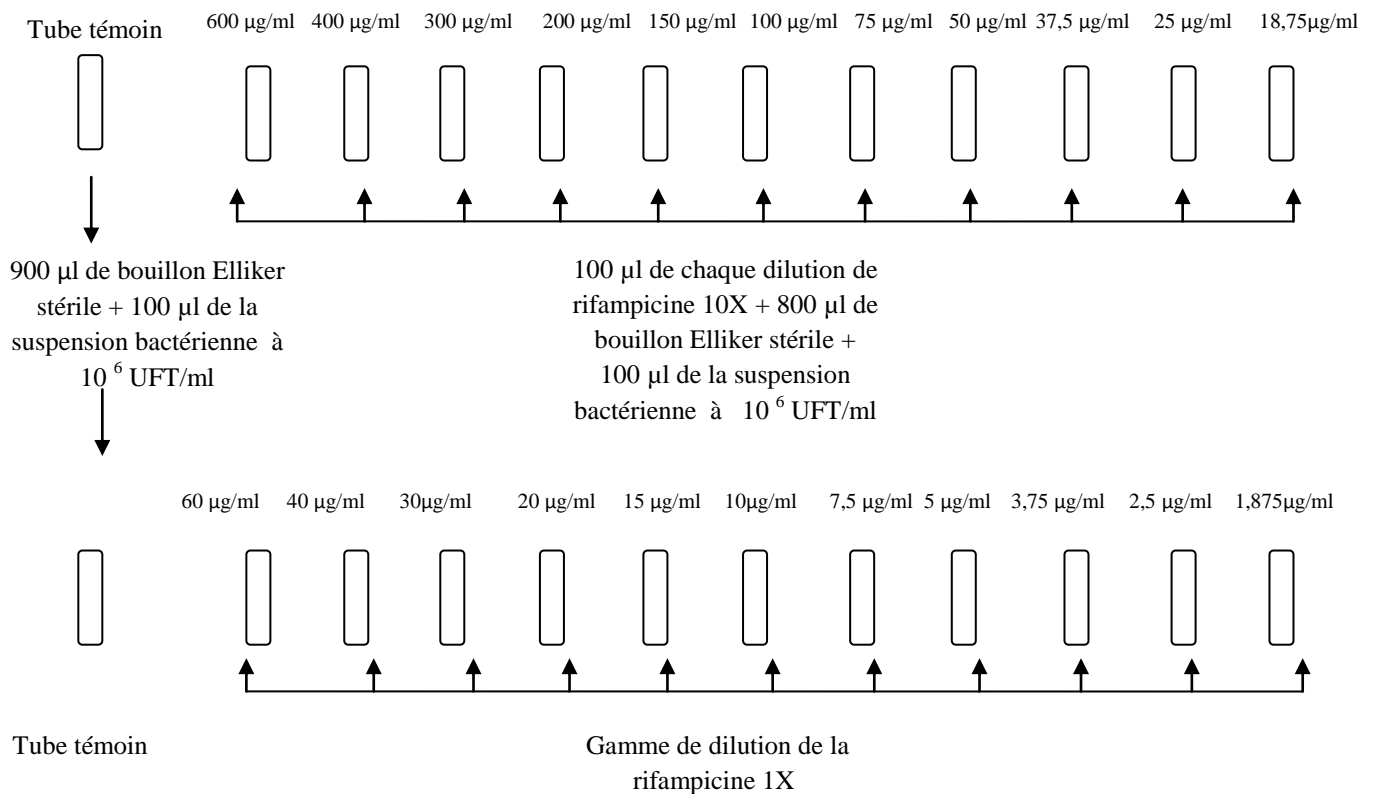
Le schéma suivant représente les étapes réalisées :



**Figure 15:** schéma détaillé des étapes de préparation de la gamme de dilution de la rifampicine 10X.

- Gamme de dilution de la rifampicine 1x dans du bouillon Elliker (60 à 1.875 µg/ml)
  - Mettre 0.8 ml de bouillon Elliker dans 11 tubes numérotés 60, 40, 30, 20, 15, 10, 7.5, 5.0, 3.75, 2.5 et 1.875.
  - Ajouter 0.1 ml des solutions de rifampicine 10x correspondantes.
  - Préparer 1 douzième tube = tube témoin avec 0.9 ml de bouillon Elliker stérile.
- Dilution de la culture bactérienne à  $10^{-2}$  (équivalent à  $10^6$  UFT/ml)
  - Mettre 0.1 ml de la culture bactérienne (Over night) dans 10 ml d'eau physiologique stérile.
- Ensemencement
  - Ajouter aux 12 tubes 0.1 ml de la dilution  $10^{-2}$  de la culture bactérienne en commençant par le tube Témoin. Incuber 24h à 37°C.

Le schéma suivant illustre les étapes entrepris pour la préparation de la gamme de dilutions de la rifampicine 1X :



**Figure 16** : schéma détaillé des étapes de préparation de la gamme de dilution de la rifampicine 1X.

### Cure des plasmides par la Novobiocine

Dans cette étape, les données sont puisées à partir du protocole de GRISEMINE pour la détermination de la CMI et donc de la concentration sub-inhibitrice, d'une part, et des résultats obtenus par l'équipe de (KALCHAYANAND, 2000), à savoir la formation de mutants de *Lactobacillus brevis*, dont les plasmides sont curés, en utilisant des concentrations de novobiocine allant de 0,25 µg/ml à 5 µg/ml pour la caractérisation génétique de la brévicine 9296.

La démarche expérimentale a pour but de localiser la CMI de la novobiocine en milieu liquide, suivant les mêmes étapes que celles réalisées pour la rifampicine, la différence est au niveau des valeurs de la gamme de dilution.

- Gamme de dilution de la Novobiocine 10x dans l'eau (50 à 2,5µg/ml)
  - A partir d'une solution mère de novobiocine à 400 mg/L, préparer une série de dilution selon l'ordre décroissant : 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml, 3,125 µg/ml et 2,5 µg/ml.
  
- Gamme de dilution de la novobiocine 1x dans du bouillon Elliker (5 à 0,25µg/ml)
  - Mettre 0.8 ml de bouillon Elliker dans 6 tubes numérotés : 5 ; 2,5 ; 1,25 ; 0,625 ; 0,3125 ; 0,25.
  - Ajouter 0.1mL des solutions de novobiocine 10x correspondantes.
  - Préparer 1 septième tube = tube témoin avec 0.9 ml de bouillon Elliker stérile.
  
- Dilution de la culture bactérienne à 10<sup>-3</sup>  
Mettre 10µL de la culture bactérienne (Over night) dans 10 ml d'eau physiologique stérile.
  
- Ensemencement
  - Ajouter aux 7 tubes 0.1 ml de la dilution 10<sup>-3</sup> de la culture bactérienne en commençant par le tube Témoin. Incuber 24h à 37°C.

#### 2-4-2-Contrôle de la cure

Après la réalisation de la cure plasmidique pour les deux souches lactiques sélectionnées (*CH05*, *CH07*), plusieurs repiquages en bouillon Nutritif enrichi suivi d'ensemencements en gélose nutritive enrichie, ont été réalisés, en parallèle avec des observations microscopiques et des colorations de Gram, ayant pour but, la vérification de la pureté des bactéries à chaque étape et l'absence de contaminants.

De plus, l'ensemencement en gélose, des bactéries dont les plasmides sont curés, permet de récupérer des colonies pures et isolées, et de réaliser des suspensions exemptes de résidus d'antibiotiques se trouvant dans le premier tube, à concentration sub-inhibitrice (obtenu lors de la gamme de dilution dans le protocole de cure plasmidique), pouvant ainsi, donner des zones d'inhibition, due à l'action de la rifampicine, ou de la novobiocine sur les bactéries de la souche cible (BERTHE *et al.*, 2008) par la méthode de diffusion des puits, ce qui donnera des faux positifs.

Cette étape de contrôle de la cure des plasmides a pour intérêt, de mettre en évidence des mutants sans plasmides formés par l'action des agents curant utilisés. Elle est réalisée par l'extraction de l'ADN bactérien, suivie de sa migration dans un gel d'agarose.

La comparaison entre les profils plasmidiques de la souche sauvage et de son variant curé est ainsi possible (protocole de KALCHAYANAND, 2000).

### 2-4-2-1-Extraction de l'ADN bactérien

L'extraction de l'ADN et la détermination des profils plasmidiques sont réalisées suivant la méthode d'ANDERSON et McKAY(1983), avec des modifications concernant les conditions de culture des souches (milieu et température différents) et les volumes des réactifs utilisés pour l'extraction (en fonction du volume de la culture bactérienne initiale : 10ml au lieu de 40 ml).

Les souches bactériennes sont cultivées dans un bouillon BHIB à 37°C pendant 18 h. La culture est alors centrifugée à 2700 g pendant 10 min et le culot bactérien utilisé immédiatement pour l'extraction de l'ADN en fonction des étapes suivantes (avec modification des volumes des réactifs utilisés):

- resuspension du culot cellulaire dans 200µl de saccharose 6,7% - Tris 50mM – EDTA 1mM, pH8,0.
- chauffage à 37°C pendant 1h.
- ajout de 100µl de Lysozyme 25mg/ml (au lieu de 10mg/ml pour les Gram négatives) dans Tris 25 mM, pH8,0.
- incubation pendant 20 minutes à 37°C.
- ajout de 40µl d'EDTA 0,25M – Tris 50mM, pH8,0.
- ajout de 20µl SDS : 20% (pds/vol) dans Tris 50mM – EDTA 20mM, pH8,0.
- mélanger immédiatement.
- incubation pendant 20min à 37°C pour compléter la lyse.
- agiter au vortex à vitesse maximal pendant 30 secs dans un éppendorf.
- ajout de 20µl d'une solution neuve de NaOH 3M.
- mélanger doucement par des inversions pendant 10min.
- ajout de 41µl de Tris 2,0 M – HCl, pH7,0.
- continuer à mélanger pendant 3min.
- ajout de 60µl de NaCl 5,0 M.
- ajout de 650µl du phénol saturé avec une solution de NaCl 3%. Mélanger.
- centrifuger à 2700g pendant 5min.
- enlever la phase supérieure et extraire avec 650µl d'un mélange de Chloroforme/Alcool isoamylique (24 : 1 v/v).
- centrifuger à 2700 g pendant 5min.
- enlever la phase supérieure et précipiter avec le même volume d'isopropanol.
- placer à -20°C pendant une nuit pour accélérer la précipitation.
- centrifuger à 11000 g pendant 5min.
- enlever l'excès d'isopropanol et sécher le culot sous vide.
- resuspendre dans 100µl de Tris 10mM – EDTA 1mM, pH7,5.
- examiner la solution d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose.

### 2-4-2-2-Electrophorèse de l'ADN bactérien

La solution d'ADN (20 µl) est mélangée à une solution de dépôt dans un rapport de 10/1 (Bleu de Bromophénol 0,5% ; EDTA 10 mM ; glycérol 50%, dans l'eau) avant d'être déposée dans les puits du gel (0,6 % d'agarose) (voir annexe 7). La solution de dépôt, en augmentant la densité de l'échantillon, permet un meilleur dépôt de l'ADN au fond des puits.

La migration de l'ADN se fait à 100 Volt (au lieu de 70 Volt pendant 14h et à 14°C, en utilisant une circulation permanente d'eau froide dans laquelle est plongée la cuve d'électrophorèse, selon le protocole original). L'ADN est révélé par réaction avec le Bromure d'éthidium (2µg/ml pendant 20min) puis visualisé dans notre unité de recherche sous fluorescence UV dans un appareil contenant une chambre à UV et équipé d'un détecteur (UV SERIAL N°12200230).

### 2-4-3-confirmation de la localisation génétique des bactériocines par le test d'activité par la méthode de diffusion des puits

Dans cette étape, le protocole du test d'activité par la méthode de diffusion des puits (2-2) est suivi pour chacune des populations bactériennes suivantes (**Tableau I**):

**Tableau I** : Distribution des groupes de souches lactiques utilisées pour le test d'activité par la méthode de diffusion des puits après le curage des plasmides.

| Les souches | Groupes 1      | Groupes 2                     |
|-------------|----------------|-------------------------------|
| CH05        | CH05 non curée | CH05 avec curage de plasmides |
| CH07        | CH07 non curée | CH07 avec curage de plasmide  |

Le test d'activité par la méthode de diffusion des puits est réalisé pour les bactéries curées par la rifampicine ainsi que pour celles curées par la novobiocine. Dans chaque boîte de pétri, trois puits sont réalisés, le premier contiendra 70µl d'eau distillée stérile (témoin négatif), le deuxième, 70µl du surnageant brute actif neutralisé récupéré à partir de la culture de la souche sauvage (témoin positif) et le troisième, 70µl du surnageant brute actif neutralisé récupéré à partir de la culture de la souche ayant subi la cure plasmidique. (par la rifampicine ou par la novobiocine).

### 2-4-4-Confirmation de la localisation génétique des bactériocines par la technique du zymogramme

Afin de vérifier la localisation des clusters de gènes codant l'activité bactériocinique, le test d'inhibition par la méthode des puits, pour les surnageant bactériociniques récupérés à partir des souches sauvages et des mutants curés, est complété par l'application du même principe pour la méthode du zymogramme pour toutes les souches étudiées.

Chaque souche est traitée suivant les étapes d'ensemencement, d'électrophorèse PAGE-SDS des extraits bactériociniques et du test d'activité par le zymogramme, avec une distribution des échantillons de façon à mettre dans les puits du gel d'électrophorèse, chaque deux groupes d'une même souche (non curée et curée respectivement), dans deux puits voisins. (Voire Annexe 6).

### **2-5-Caractérisation génétique des protéines d'immunité aux bactériocines**

La majorité des bactéries productrices de bactériocines sont capable de produire des protéines d'immunité qui leur confèrent une protection contre leur propre toxine (JOHNSEN *et al.*, 2004). Les protéines d'immunité sont en général spécifiques à chaque souche productrice, mais peuvent aussi dans quelques cas protéger la souche productrice contre des bactériocines phylogénétiquement proches vis-à-vis de sa propre bactériocine (FIMLAND *et al.*, 2002, JOHNSEN *et al.*, 2004). Vingt protéines d'immunité de vingt bactériocines de classe IIa ont été caractérisées à ce jour (FIMLAND *et al.*, 2005).

Les protéines d'immunité des bactériocines de classe IIa sont hydrophobes et sont formées de 88 à 115 acides aminés. Nous avons testé dans cette étape, la sensibilité de la souche lactique à sa propre bactériocine avant et après la cure plasmidique, dans le but de localiser les déterminants génétiques de l'immunité à la bactériocine. Selon le protocole de KALCHAYANAND (2000), les souches lactiques ainsi que leurs variants curés sont soumis à l'action de la bactériocine parentale produite par la même souche. Le test est réalisé par la méthode de diffusion des puits. Chaque surnageant brute actif est utilisé sur deux boîtes, l'une inoculée par la souche sauvage et l'autre par son variant curée.

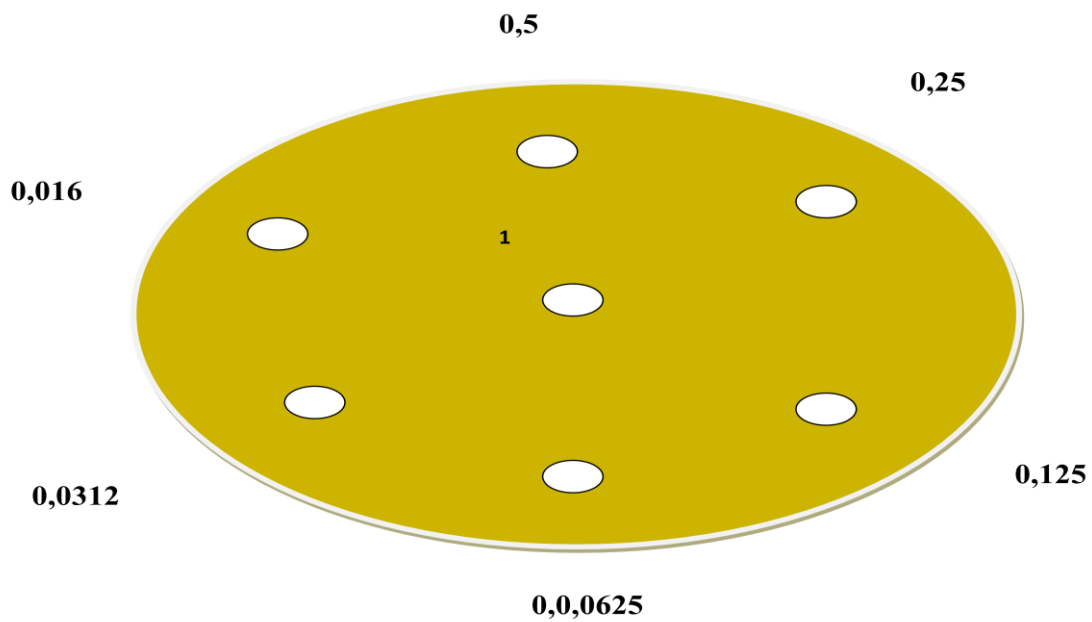
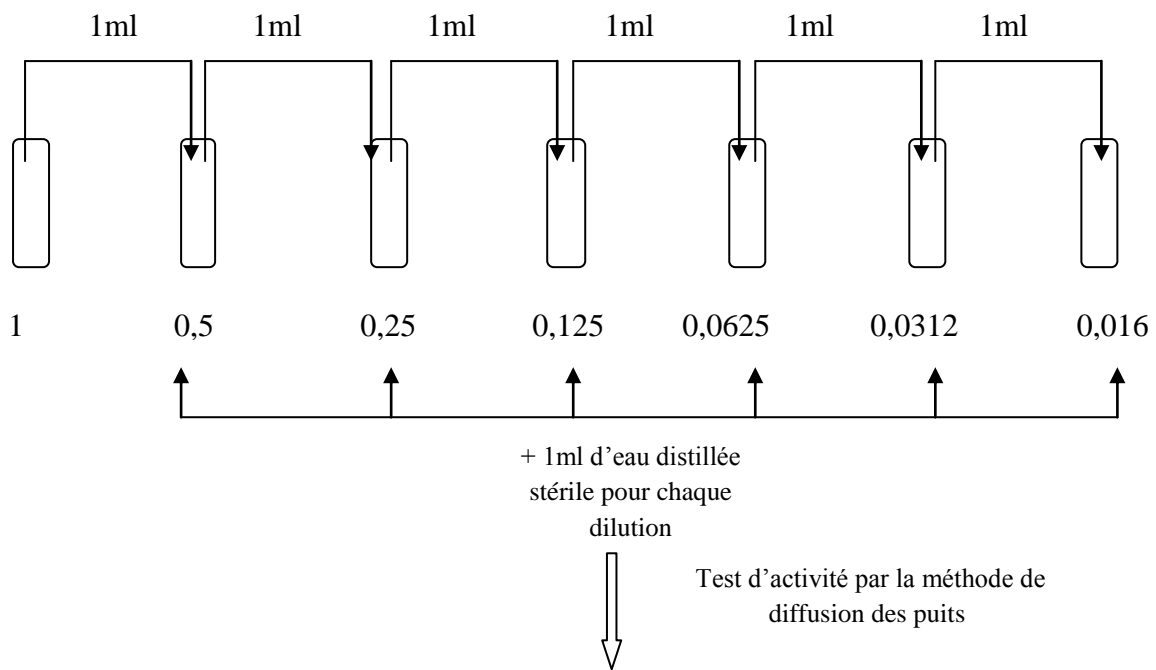
### **2-6-Détermination de la concentration minimale inhibitrice des bactériocines en unité arbitraire (U.A/ml) :**

Nous avons utilisé la méthode des dilutions critiques pour la détermination de l'activité sur milieu gélosé, par la méthode de diffusion des puits (principe expliqué dans la partie bibliographique : III-3-2-1-Détermination du titre en bactériocines).

Selon le protocole de SEBTI *et al* (2002), A partir d'une série de dilution de demi en demi effectuée à la solution mère de bactériocines, obtenue par la méthode d'adsorption/désorption de YANG (1992), 70 µl de chaque dilution sont déposés dans un puits. Les boîtes de Pétri sont alors incubées à 37 °C pendant 24 h. La concentration en bactériocines en unité arbitraire ramenée au ml, correspond à l'inverse de la dilution ultime, pour laquelle une zone d'inhibition est encore visible.

La série de dilution réalisée pour chaque extrait bactériocinique est la suivante :

1 ; 0,5 ; 0,25 ; 0,125 ; 0,0625 ; 0,0312 ; 0,016.



**Figure 17** : Schéma illustrant les étapes de détermination des CMI des bactériocine.

# Résultats et discussions

### 1-Test d'inhibition par la méthode de diffusion par puits et sensibilité aux protéases

La culture bactérienne des souches productrices de bactériocines est réalisée en anaérobiose, ce qui évite la formation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La neutralisation des pH des surnageant brutes actifs éliminent, quant à elle, l'effet de l'acidité due à l'acide lactique. Par conséquent, l'apparition de zones d'inhibitions autour des puits contenant les surnageant actifs, et la disparition d'une telle activité par addition des enzymes protéolytiques (Trypsine et pepsine) confirme d'une part la nature protéique des bactériocines produites et d'autre part l'action anti-*listeria*.

Le tableau qui suit résume les diamètres des zones d'inhibition obtenues :

**Tableau II** : Valeurs des diamètres des zones d'inhibition dues à l'activité bactériocinogène

| Souches lactiques                                | Surnageant actifs<br>(diamètre des zones<br>en mm) | Surnageant actifs<br>+ trypsine<br>(diamètre des zones<br>en mm) | Surnageant actifs<br>+ pepsine<br>(diamètre des zones<br>en mm) |
|--|--|--|---|
| <i>Lactococcus lactis ssp lactis CH05</i>        | 14   | 0  | 0   |
| <i>Lactococcus lactis ssp raffinolactis CH07</i> | 13   | 0  | 0   |
| <i>Lactococcus lactis ssp lactis CH 08</i>       | 08   | 0  | 0   |
| <i>Lactobacillus brevis/buchneri CH15</i>        | 16   | 13   | 16  |

Les quatre souches de bactéries lactiques ont exprimé des activités inhibitrices vis à vis de *Listeria innocua*, par la production de bactériocines et ont donné des zones d'inhibition dont les diamètres respectifs sont : 14 mm, 13 mm, 08 mm et 16 mm pour les souches : *Lactococcus lactis ssp lactis CH05*, *Lactococcus lactis ssp raffinolactis CH07*, *Lactococcus lactis ssp lactis CH08* et *Lactobacillus brevis/buchneri CH15*, respectivement.

Par la même technique, des bactériocines inhibant *Listeria innocua* et produites par le genre *lactococcus* ont été caractérisées dans un atelier de salaison de produits laitiers, par YAKOUBI *et al* en 2006.

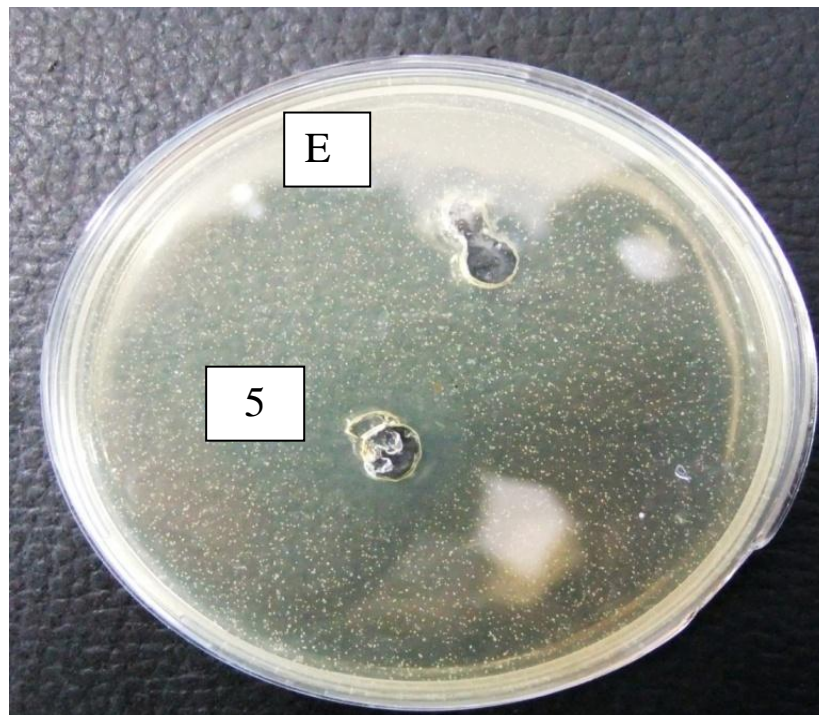
OGUNBANWO *et al* (2003) et SIMOVA *et al* (2008) ont identifié de bactériocines produites par les deux genres *lactococcus* et *lactobacillus*, et capables d'inhiber des souches Gram positif dont *Listeria innocua F*.

L'activité anti-*listeria* d'une bactériocine de classe IIa, la *mesentericine 52A* a été étudiée par le test de diffusion des puits par JASNIEWSKI *et al* en 2008.

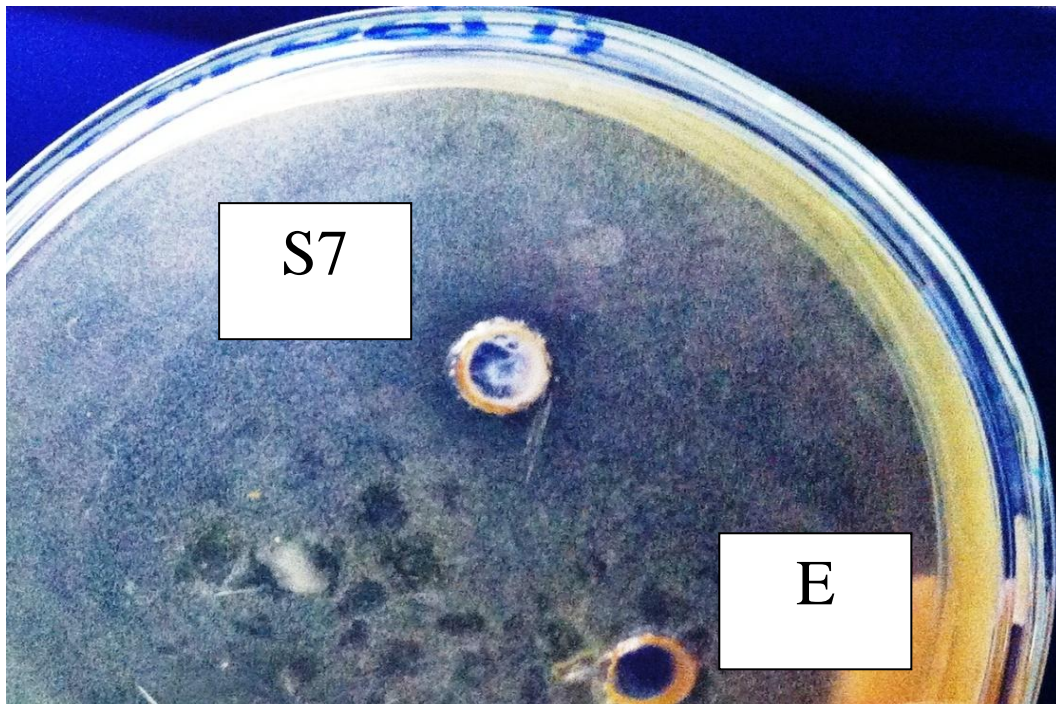
Cependant, plusieurs auteurs, ont pu caractériser, dans la même niche, et en utilisant la même méthode d'activité antibactérienne, des bactériocines produites par les deux genres, *Lactococcus* et *Lactobacillus*, et actives contre les bactéries du genre *Listéria*. La *Lactococcine BZ* produite par *Lactococcus lactis* ssp *lactis* BA (SAHINGIL *et al.*, 2009), la *Bozacine 14* produite par *Lactococcus lactis* ssp *lactis* B14 (KABADJOVA *et al.*, 2000), la *ST69BZ* produite par *Lactobacillus plantarum* ST69BZ (TODOROV, 2010).

De leurs côtés, MAKHLOUFI *et al.*, en 2011, ont identifié une bactériocine produite par une souche de *Leuconostoc pseudomesenteroides*, isolée à partir du Boza (une boisson bulgare) et active contre *Listeria monocytogenes*, par l'utilisation du test d'activité par la méthode de diffusion des puits.

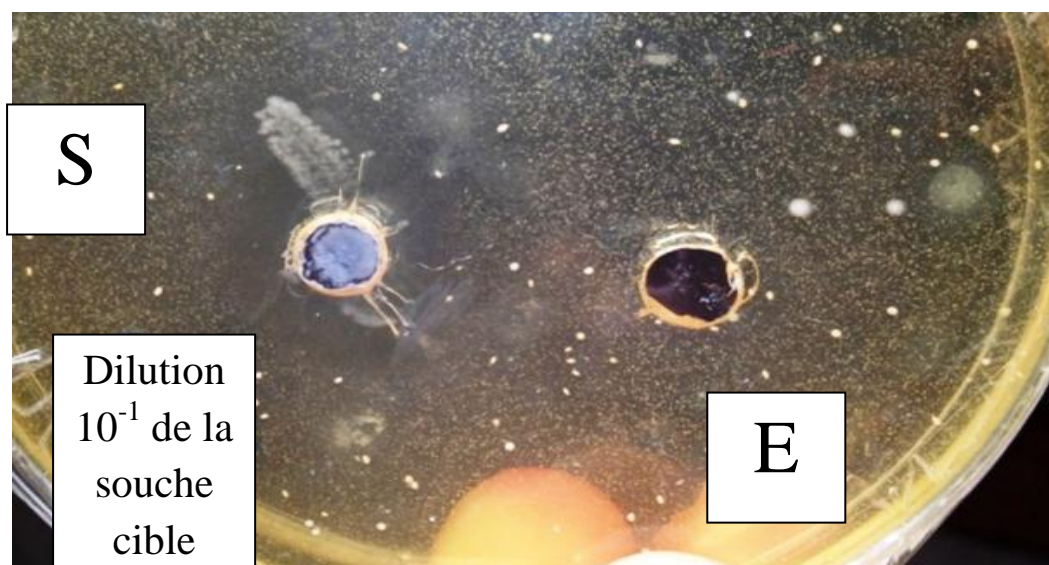
La même année, une bactériocine produite par *lactobacillus plantarum* LMG P-26358 isolée d'un fromage traditionnel français, a été identifiée par la méthode de diffusion sur agar. Il s'agit d'une molécule stable à une température de 100°C et à des pH compris entre 1 et 10, présentant un degrés d'homologie de 100% avec la plantaricine 423 et ayant une activité inhibitrice à l'égard de plusieurs bactéries parmi lesquelles, *listeria innocua* et *listeria monocytogenes* (MILLS *et al.*, 2011). Les figures suivantes montrent les résultats obtenus par la méthode de diffusion sur puits :



**Figure 18 :** Activité des bactériocines produites par la souche CH05.  
E : 70  $\mu$ l d'eau distillée stérile, 5 : 70  $\mu$ l de surnageant brut actif neutralisé de la souche CH05.



**Figure 19 :** Activité des bactériocines produites par la souche CH07.  
E : 70 µl d'eau distillée stérile, S7 : 70 µl de surnageant brut actif neutralisé de la souche CH05.

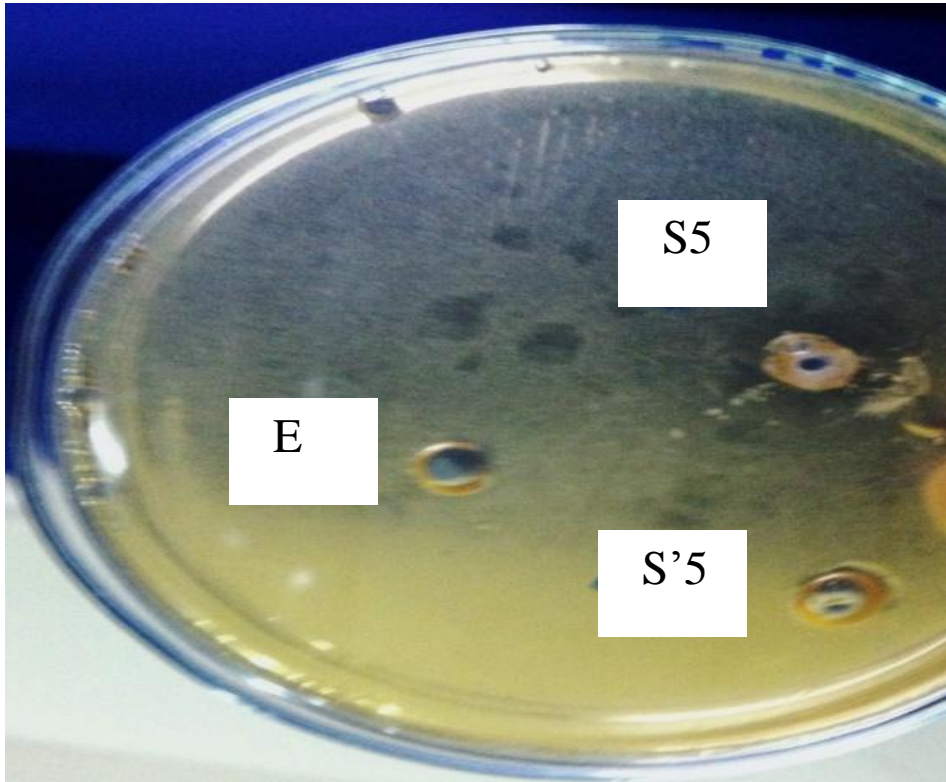


**Figure 20 :** Activité des bactériocines produites par la souche CH08.  
E : 70 µl d'eau distillée stérile, S : 70 µl de surnageant brut actif neutralisé de la souche CH08.

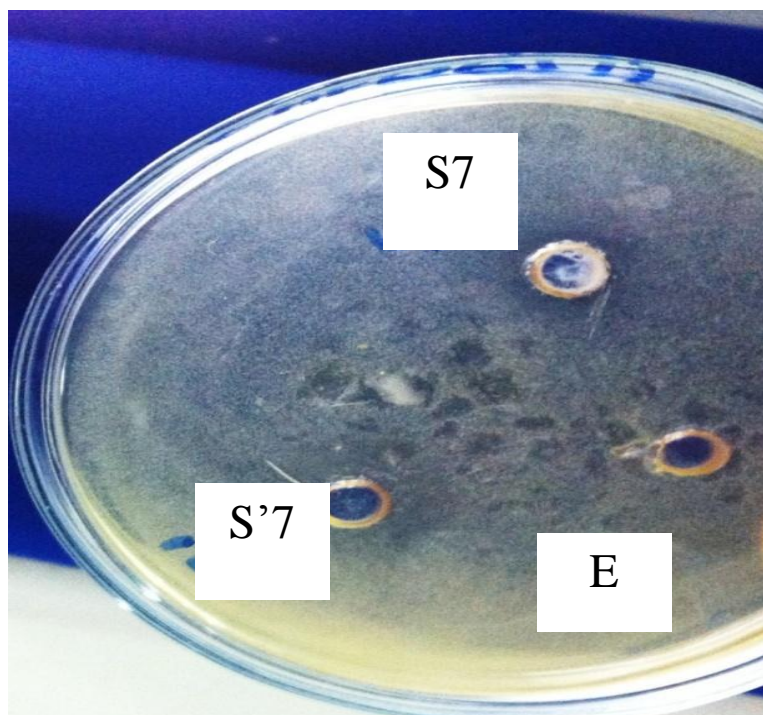
Nous avons essayé de réaliser une étape de désorption basée sur le principe de YANG (1992), afin d'avoir un maximum de bactériocines dans le surnageant. Pour cela, après la première centrifugation, nous avons récupéré le premier surnageant actif S, puis à partir de là, le culot est solubilisé de nouveau dans 1ml de solution de désorption et centrifugé à 8000g pendant 30 min. Cela permet de décrocher d'éventuelles molécules fixées sur les parois bactériennes. Après la centrifugation, le surnageant (S') est récupéré.

Nous avons suivi ce test pour les deux souches CH05 et CH07, où les surnageant S5, S'5 et S7, S'7 sont obtenus respectivement, leur pH sont neutralisés, puis ils sont soumis au test d'activité par la méthode de diffusion par puits en contact avec une culture over-night de la souche cible.

Dans chaque boîte, trois puits sont réalisés, le premier contient 70µl d'eau distillée stérile (témoin négatif), le deuxième contient 70µl du surnageant S (témoin positif) et le troisième contient 70µl du surnageant S'. Les images ci-après illustrent les résultats obtenus lors de cette étape :



**Figure 21 :** Activité des bactériocines produites par la souche CH5.(avec essai de désorption).  
E : 70 µl d'eau distillée stérile, S5 :70 µl de surnageant brut actif neutralisé de la souche CH05, S'5 :70 µl de surnageant brut actif neutralisé de la souche CH05, et après désorption acide.



**Figure 22 :** Activité des bactériocines produites par la souche CH07 (avec essai de désorption). **E :** 70  $\mu$ l d'eau distillée stérile, **S7 :** 70  $\mu$ l de surnageant brut actif neutralisé de la souche CH07, **S'7 :** 70  $\mu$ l de surnageant brut actif neutralisé de la souche CH07, et après désorption acide.

Comme on le voit sur les images, pour les deux souches, des zones d'inhibition apparaissent autour des puits où on a déposé le surnageant S exprimant l'activité antilisteria des bactériocines excrétées et récupérées dans le premier surnageant de culture, tandis qu'aucune activité n'est observée au niveau des surnageant S'. Ce qui laisse supposer que nos souches produisent des bactériocines libres dans le milieu de culture. Et que la totalité de ces molécules sont récupérées dans le premier surnageant, étant donné qu'à pH acide de la culture, ces bactériocines ne sont pas liées sur les cellules bactériennes.

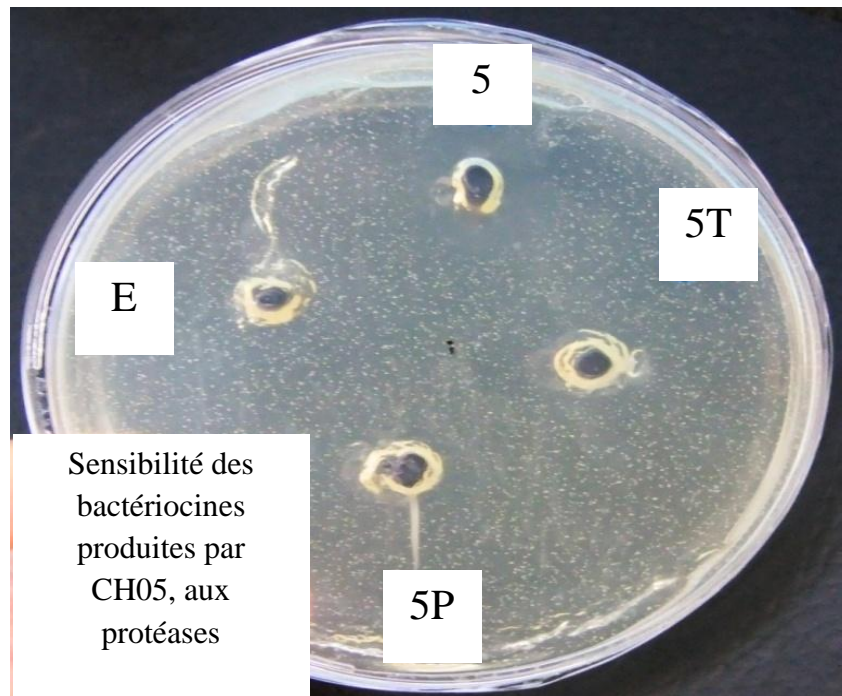
Cette hypothèse est appuyée par un dosage des protéines au niveau des deux types de surnageant S et S' pour la souche CH07, potentiellement bactériocinogène, en utilisant la méthode d'absorption aux UV, et une gamme étalon avec l'albumine bovine (BSA). Le résultat montre une différence de concentration en protéines avec 3,52mg/ml pour S<sub>CH07</sub> et 1,32mg/ml pour S'<sub>CH07</sub>.

Pour l'inactivation aux protéases, les zones d'inhibition sont affectées par les enzymes protéolytiques pour les trois souches : CH05, CH07 et CH08. (Voir les valeurs des zones d'inhibition sur le **tableau II** ci-dessus). Ces résultats confirment la nature protéique de la partie biologiquement active des bactériocines produites par ces souches, d'une part, et indiquent la sensibilité de ces molécules à la trypsine et à la pepsine. Pour le même intérêt, des enzymes telles que : la trypsine, l' $\alpha$ -chymotrypsine et la pepsine sont couramment employées (CHEN *et* HOOVER, 2003).

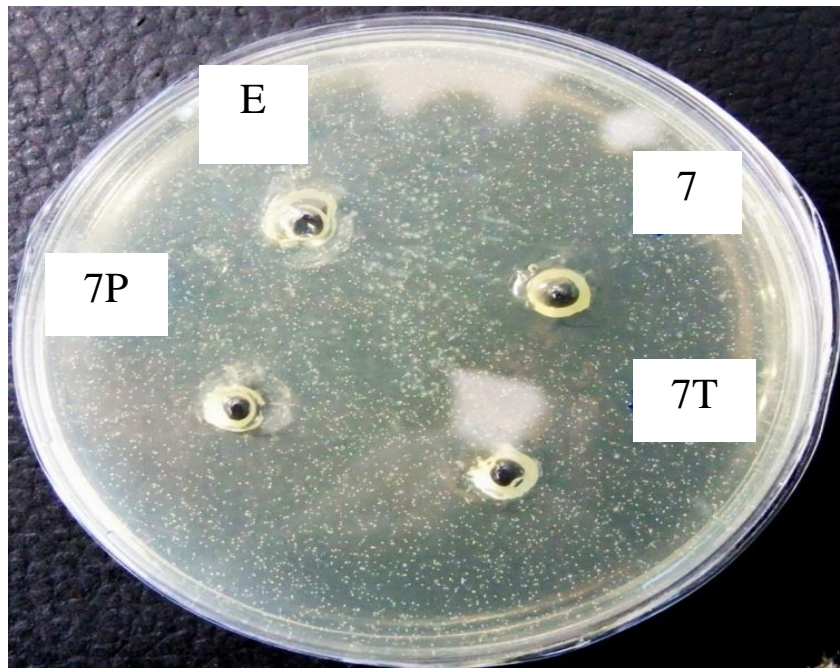
La confirmation de la nature peptidique d'une bactériocine produite par une souche de *Leuconostoc pseudomesenteroides*, isolée du Boza, une boisson traditionnelle fermentée à base de céréales consommée en Turquie, est réalisée en utilisant la trypsine, la pepsine et la protéinase K (MAKHLOUFI *et al*, 2011).

La trypsine a légèrement affecté l'activité de la souche *Lactobacillus brevis/buchneri* en diminuant le diamètre de la zone d'inhibition de 16 mm à 13 mm, ce qui est dû, probablement, à la diminution de la concentration en bactériocines dans le puits par l'effet de dilution au demi, après ajout du même volume, de solution enzymatique.

L'activité de la même souche n'est, cependant pas affectée, par l'action de la pepsine, en gardant le diamètre de la zone d'inhibition à 16 mm, en présence et en absence de l'enzyme. Ces résultats suggèrent la résistance des bactériocines produites par la souche CH15, à la trypsine et à la pepsine respectivement. Les figures suivantes illustrent les résultats des inactivations aux protéases :



**Figure 23:** Inactivation aux protéases, des bactériocines produites par la souche CH05.  
**E :** 70  $\mu$ l d'eau distillée stérile, **5 :** 70  $\mu$ l de surnageant brut actif neutralisé de la souche CH05, **5T :** 70  $\mu$ l du mélange surnageant brut actif neutralisé de la souche CH05 et de la solution enzymatique de trypsine (1/1 : v/v),  
**5P :** 70  $\mu$ l du mélange surnageant brut actif neutralisé de la souche CH05 et de la solution enzymatique de pepsine (1/1 : v/v).



**Figure 24 :** Inactivation aux protéases des bactériocines produites par la souche CH07.  
E : 70  $\mu$ l d'eau distillée stérile, 7 : 70  $\mu$ l de surnageant brut actif neutralisé de la souche CH07, 7 T : 70  $\mu$ l du mélange surnageant brut actif neutralisé de la souche CH07 et de la solution enzymatique de trypsine (1/1 : v/v), 7P : 70  $\mu$ l du mélange surnageant brut actif neutralisé de la souche CH07 et de la solution enzymatique de Pepsine (1/1 : v/v).

## 2-Purification des bactériocines et test d'activité par la technique du zymogramme

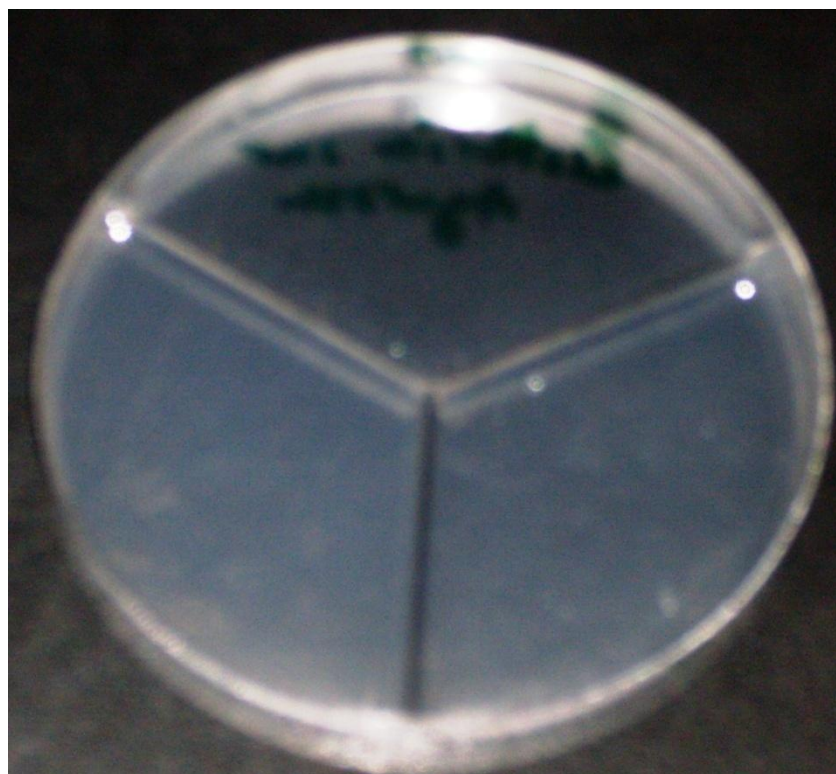
A cette étape, nous tenons à signaler l'originalité du travail quant à la méthode d'activité par le zymogramme et la source d'isolement des bactéries. Le lait de chamelle est peu exploité à cette effet, d'où la difficulté à interpréter nos résultats, cependant, la même technique du zymogramme a été appliquée pour la recherche d'activité bactériocinogène par d'autres auteurs et sur d'autres niches.

Nous avons, donc, adopté la méthode d'extraction acide ayant pour principe l'adsorption et la désorption des molécules sur les cellules productrices de bactériocines, préconisée par YANG *et al.*, en 1992. La même technique a été suivie par ALLOUCHE *et al* en 2010, à l'INA d'El Harrach, pour la purification de bactériocines produites par des souches de lactobacilles thermophiles, utilisées dans l'industrie laitière.

En 2001, MAO *et al*, ont purifié une bactériocine produite par *lactococcus lactis* FS92 isolée à partir de porc et ont déterminé son PM à l'aide d'une migration par PAGE –SDS suivie d'une révélation biologique par la technique du zymogramme.

Toujours par la même méthode, l'activité antibactérienne d'une autre bactériocine produite par une souche de *lactococcus sp* GM 005 isolée à partir d'une pâte japonaise à base d'haricot, de soja et de riz, a été étudiée par ONDA *et al* en 2002.

Dans notre étude, l'aspect des zones d'inhibition sur le gel d'agarose a été discuté. Ces dernières apparaissent opaques, sur fond noir, par rapport au reste du gel où il ya un parfait développement du tapis bactérien de la souche cible *Listeria innocua F*. Afin de justifier cela, un test témoin a été réalisé : dans une boîte de Pétri compartimentée en trois, nous avons coulé de l'agarose stérile dans deux compartiments, tandis que nous avons rempli l'autre, par de l'agarose préalablement inoculé par le même inoculum d'une culture Over-Night de la souche cible, qu'on utilise pour le test du zymogramme. Après incubation, dans les même conditions de temps et de température que le test du zymogramme, Les compartiments stériles sont resté opaques, quant à celui ensemencé par la souche cible, il est devenu transparent. La photo de la **figure 22** montre le résultat de ce test.

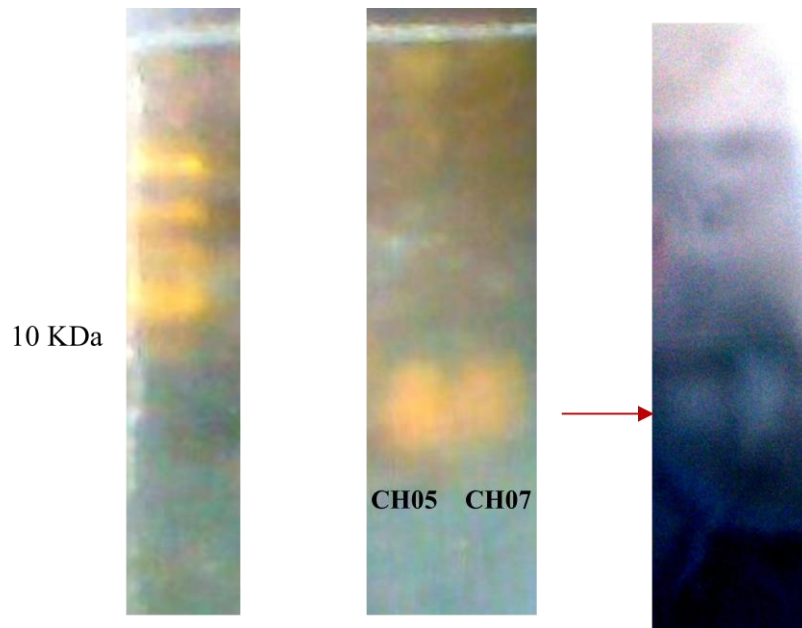


**Figure 25 :** Différence d'aspect entre un gel d'agarose ensemencé **A** par la souche cible et un gel d'agarose stérile **B**, et qui justifie l'apparition des zones d'inhibition sur le zymogramme.

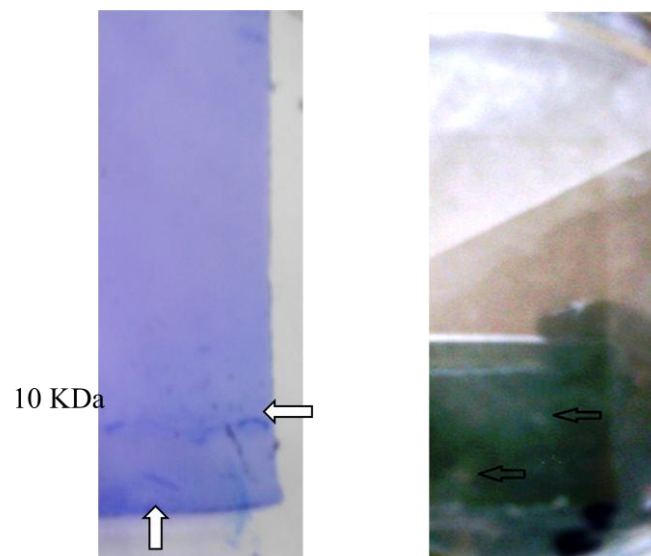
Le virage de couleur du milieu de culture serait dû à une interaction moléculaire entre les constituants de l'agarose et les métabolites microbiens des bactéries *Listeria innocua F* qui sont développées.

Les bactériocines séparées par électrophorèse ont exprimé des activités inhibitrices à l'égard de la souche cible. En superposant les deux moitiés (colorée et non colorée) de chaque gel, les zones d'inhibition pour toutes les molécules actives, sont situées à des PM au-dessous de 10 Kda.

Les photos des figures suivantes illustrent les résultats des zymogrammes des différentes souches étudiées :



**Figure 26 :** Bandes électrophorétiques (à gauche) des deux souches CH05 et CH07 respectivement, ainsi que leurs zones d'inhibition par la technique du zymogramme (à droite).



**Figure 27 :** Bandes électrophorétiques (à gauche) des deux souches CH08 et CH15 respectivement, ainsi que leurs zones d'inhibition par la technique du zymogramme (à droite).

L'estimation des PM a donné des valeurs de 8,4 KDa ; 9,2 KDa ; 8,4 KDa et 9,6 KDa.

Par la même méthode, PHUONG *et al* en 2009, ont détecté la présence, dans un extrait hydrosoluble d'Asiago d'allevio (un fromage italien), de composés de poids moléculaire compris entre 3KDa et 10 kDa et inhibant la croissance de *Listeria innocua* LRGIA 01.

Au début, ces composés sont assimilés soit à des bactériocines ou à des petits fragments de caséines à activité antimicrobienne, alors que HAYES *et al* (2006) ont démontré que les PM de ces derniers n'excèdent pas 1000Da, ce qui oriente l'identification à des bactériocines.

### 3- Caractérisation génétique des bactériocines

La compréhension des mécanismes d'inhibition des flores protectrices vis-à-vis de flores cibles a fait l'objet de nombreux travaux pour les bactéries lactiques productrices de bactériocines. Dans certains cas, elle est étudiée en utilisant des mutants ou des variant non producteurs de bactériocines qui montrent une activité moindre ou absente (RICHARD *et al.*, 2003 ; NILSSON *et al.*, 2004). Dans d'autres études, l'activité est comparée à l'utilisation de souches proches ne montrant pas d'inhibition (YAMAZAKI *et al.*, 2003 ; YAMAZAKI *et al.*, 2005 ; TAHIRI *et al.*, 2009).

Dans notre travail, nous avons comparé l'activité bactériocinogène des souches à leurs variants dont les plasmides sont curés par l'utilisation de la rifampicine et de la novobiocine comme agents curant.

Le tableau ci-après montre les résultats en CMI de la cure plasmidique pour les deux souches CH05 et CH07, par l'utilisation des deux antibiotiques :

**Tableau III** : résultats de la cure plasmidique en Concentrations minimales inhibitrices :

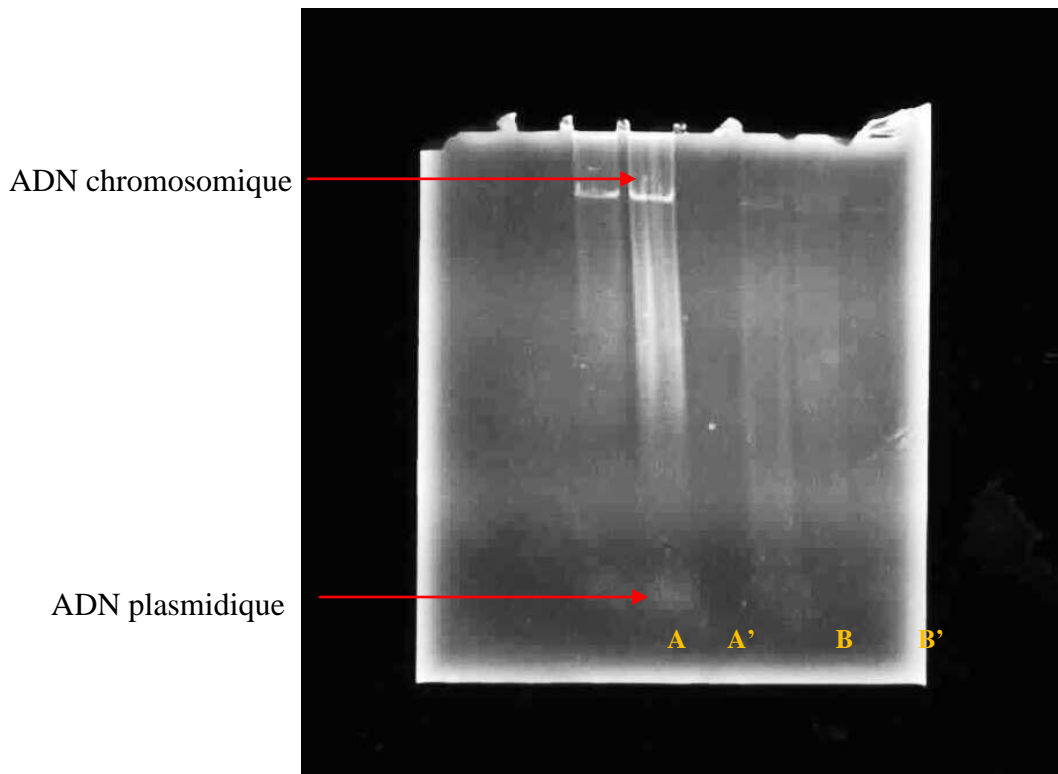
| Souches curées   | <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i><br>CH05 | <i>Lactococcus lactis ssp</i><br><i>raffinolactis</i> CH07. |
|------------------|--|---|
| Agents<br>Curant |  |   |
| Rifampicine      | 3,75 µg/ml                                   | 3,75 µg/ml  |
| Novobiocine      | 1,25 µg/ml                                   | 1,25 µg/ml  |

La CMI est la plus faible concentration d'antibiotique qui inhibe toute croissance visible d'un micro-organisme après 24h d'incubation dans un milieu de croissance spécifique. La concentration sub-inhibitrice est la concentration de l'antibiotique la plus proche de la CMI (JARLIER, 2004).

Selon les dilutions utilisées, et à partir des résultats des CMI, les valeurs des concentrations sub-inhibitrices ayant permis la cure des plasmides sont pour les deux souches : 2,5 µg/ml et 0,625 µg/ml pour la rifampicine et la novobiocine, respectivement.

### 3-1-Vérification de la cure plasmidique

La migration sur gel d'agarose à 0,6%, de l'extrait d'ADN bactérien total, et sa visualisation sous UV après réaction avec du BET ont révélé la formation de mutants curés, le résultat est montré dans la figure suivante :



**Figure 28 :** Résultat de l'électrophorèse de l'ADN bactérien total et illustrant les profils plasmidiques pour les variants CH05 (A), CH05 curée (A'), CH07 (B) et CH07 curée (B').  
Voire schéma de l'annexe 7 pour la répartition des échantillons sur le gel de migration.

La photo montre la disparition, chez le mutant curé, d'une bande correspondant à l'ADN plasmidique.

Il est à noter que la pureté de l'extrait d'ADN est confirmé par le dosage en UV, aux deux longueurs d'onde 260nm et 280nm suivi du calcul du rapport entre les deux absorbances:

$A_{260nm}/A_{280nm}$ . Selon MIKKELSEN *et al* (2004) : un échantillon d'ADN pur donne une valeur égale à 1,8 du rapport entre ces deux longueurs d'onde, et que selon les cas suivants :

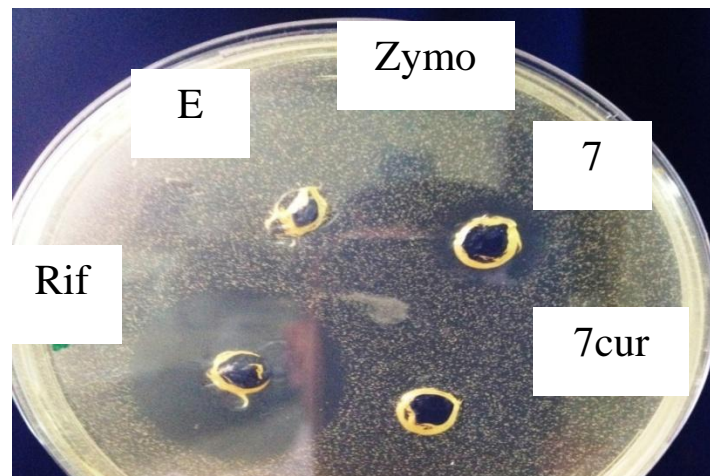
$A_{260nm}/A_{280nm} < 1,8$  : présence de protéines (échantillon contaminé par des protéines).

$A_{260nm}/A_{280nm} > 1,8$  : présence d'ARN.

Dans notre cas, le rapport a donné une valeur de 1,97, ce qui indique la présence d'ARN justifiée par la suppression obligatoire de l'étape de traitement de l'échantillon par l'ARNase lors de l'extraction, par manque de ce réactif. Cependant, la présence d'ARN n'est pas prononcée puisqu'elle n'a pas interféré avec le résultat recherché.

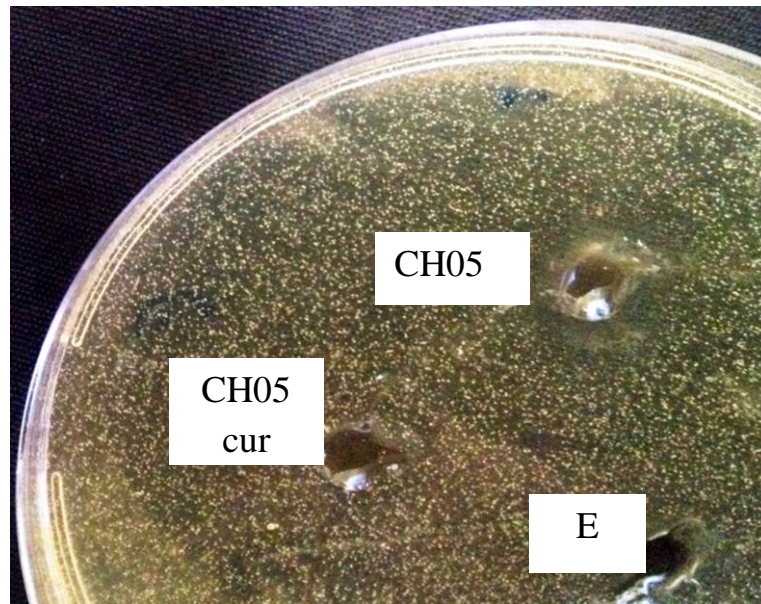
### 3-2- Caractérisation génétique des bactériocines par le test d'activité par la diffusion des puits

La réalisation du test d'activité par la méthode de diffusion des puits, des surnageant brutes actifs neutralisés pour les deux souches CH05 et CHO7 ainsi que de leurs variants curés a montré la disparition des zones d'inhibition après la cure plasmidique. Les figures suivantes illustrent ces résultats :



**Figure 29:** Disparition de l'activité bactériocinique de la souche CH07 après la cure plasmidique.

Sur la même photo, la grande zone d'inhibition correspond à la sensibilité de la souche cible *Listeria innocua* F à la rifampicine avec une concentration de 3,75 µg/ml, qui est la valeur de la CMI du même antibiotique, obtenue lors de la cure plasmidique.



**Figure 30 :** Disparition de l'activité bactériocinique de la souche CH05 après la cure plasmidique. **E :** Eau distillée stérile (témoin négatif).

Les résultats obtenus confirment donc que les gènes codants pour les bactériocines produites par les deux souches CH05 et CH07 sont portés par des plasmides.

BENOIT *et al* (1996) ont mis en évidence la localisation des gènes codant pour la brevicine SB27, ainsi que ceux codant l'immunité à cette bactériocine, sur un plasmide, après cure plasmidique à la novobiocine aboutissant à l'obtention d'un variant non producteur de bactériocine et sensible à la bactériocine parentale. L'analyse des profils plasmidiques montrent la disparition d'une bande de 3Mda pour ce variant.

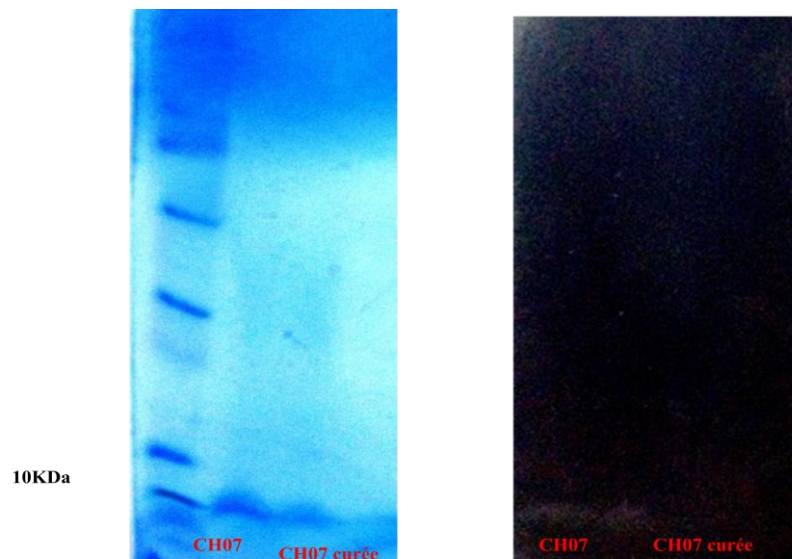
Par la même méthode, l'équipe de KALCHAYANAND (2000) ont étudié l'emplacement génétique d'une bactériocine anti-*listeria*, la brévicine 9296 produite par une souche de *Lactobacillus brevis* 9296 isolée à partir du fromage de munster. Des variants Bac<sup>-</sup> ont été obtenus par la cure plasmidique à la novobiocine à des concentrations allant de 0,25 µg/ml à 5 µg/ml. La disparition de l'activité anti-*listeria* après la cure des plasmides confirme la localisation plasmidique du locus codant cette bactériocine.

D'autres part, MERZOUG *et al* (2010) ont caractérisé les gènes codant la *lactococcine* GHB15 produite par *Lactococcus lactis* ssp *diacetylactis* GHB15, par des expériences de transformation bactérienne suivie d'un curage de l'ADN plasmidique par le SDS à différentes concentrations et une incubation à une température de 39°C. L'apparition du caractère Bac<sup>+</sup> chez la bactérie receveuse du plasmide pGHB15 de 5,3Kpb, et la disparition du même caractère chez le variant curé de la souche donatrice, confirme la localisation plasmidique de la bactériocine.

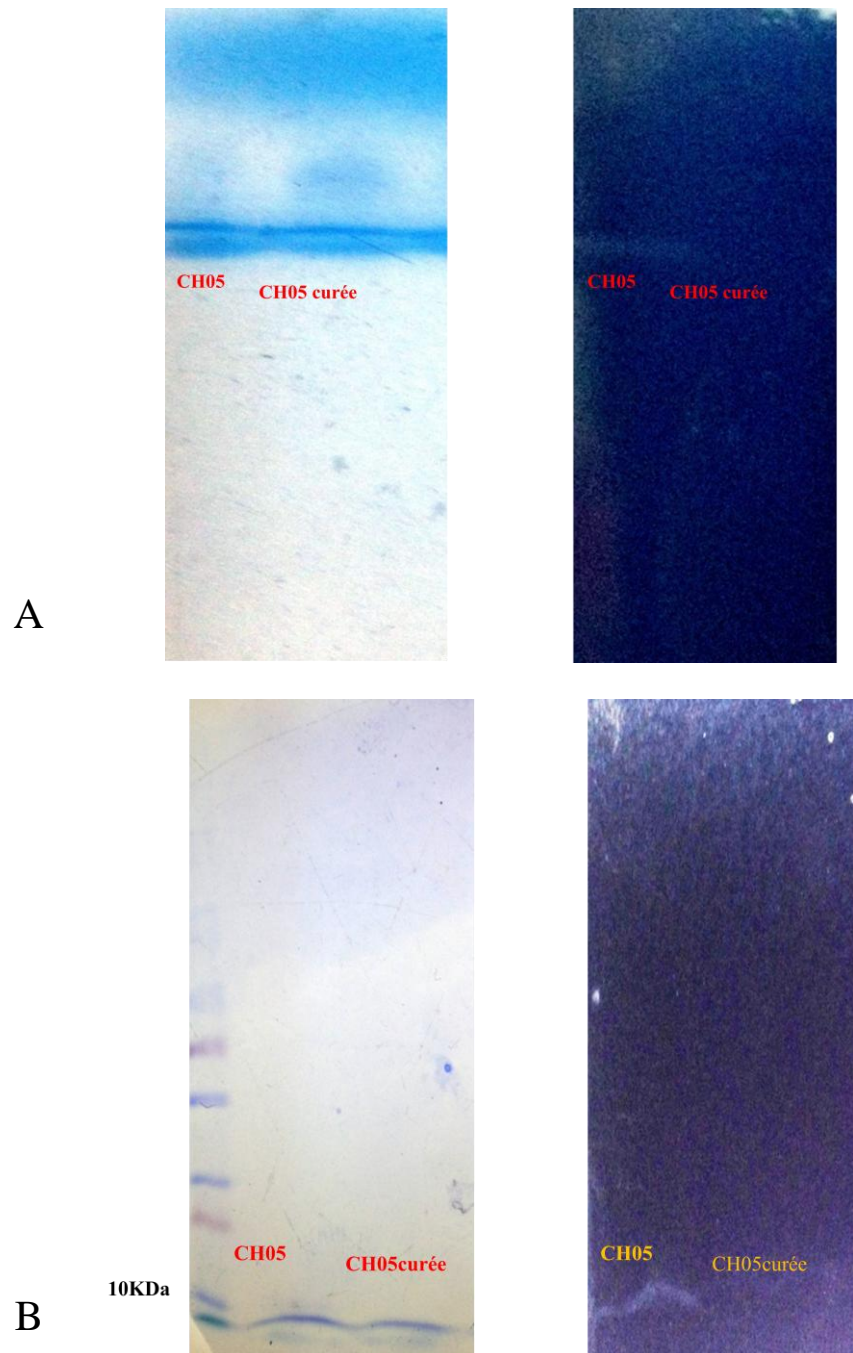
### 3-3- Caractérisation génétique des bactériocines par la technique du zymogramme

Afin de compléter les résultats obtenus, les extraits de bactériocines récupérés à partir des cultures des deux souches CH05 et CH07 ainsi que de leurs variants curés respectifs, sont soumis à la migration sur PAGE-SDS et au test d'activité par la technique du zymogramme, afin de pouvoir comparer les profils protéiques ainsi que les zones d'inhibitions. La répartition des échantillons sur le gel d'électrophorèse est illustrée dans le schéma de l'annexe 6.

Les photos suivantes montrent les résultats obtenus :



**Figure 31 :** Disparition de la zone d'inhibition après la cure plasmidique de la souche CH07, par la méthode du zymogramme.



**Figure 32 :** Disparition de la zone d'inhibition après la cure plasmidique de la souche CH05, par la méthode du zymogramme.

**A :** migration incomplète des bandes au temps t<sub>1</sub>, **B :** migration complète des bandes à un temps t<sub>2</sub>.

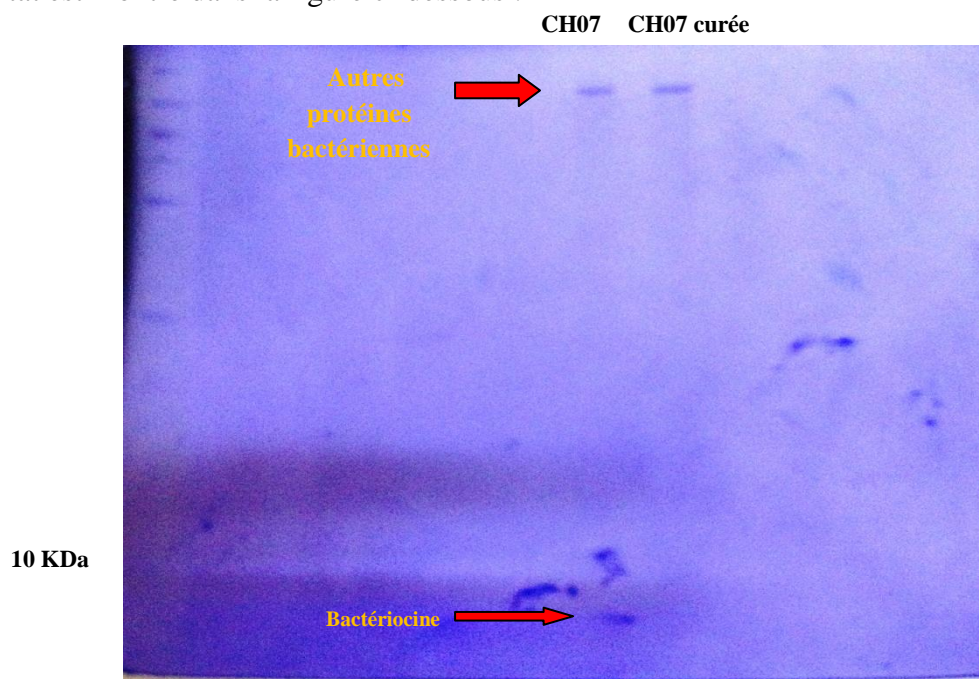
Les photos montrent des activités anti-*listeria* situées à un PM de 10Kda pour les deux souches CH05 et CH07, et la disparition d'une telle activité chez les variants curés des mêmes souches respectivement. Autrement dit, l'exclusion du plasmide de la souche Bac +, rend cette dernière, une souche Bac -.

La disparition du phénotype bactériocinogène, après la cure des plasmides prouve que les gènes codant ces bactériocines sont portés par des plasmides.

Par la même démarche, les gènes de structure ainsi que ceux d'immunité de la plantaricine 423, une bactériocine de classe IIa produite par *Lactobacillus plantarum* isolée à partir de la viande de boeuf sont caractérisés. Les séquences génétiques sont localisées sur le plasmide PLA4 (VAN REENEN *et al.*, 2006).

Une année plus tard, par le même protocole, il a été montré que la salivaricine B (SalB), une bactériocine produite par *Streptococcus salivarius* et ayant un PM de 2,74 Kda, est codée par un locus génétique porté sur un mégaplasmide (HYINK *et al.*, 2007).

Au niveau des profils électrophorétiques obtenus, nous avons remarqué la disparition de la zone d'inhibition de la souche cible à PM inférieur à 10 Kda, mais au niveau de la moitié du gel, colorée au bleu de coomassie, la bande protéique apparaît toujours. L'idée de l'existence d'une autre protéine bactérienne de PM proche de celui de la bactériocine étudiée, nous a poussé à réaliser une séparation électrophorétique sur un gel plus réticulé de 20%. Le résultat est montré dans la figure ci-dessous :



**Figure 33 :** Disparition, par effet de la cure plasmidique, de la bande protéique correspondant à la bactériocine produite par la souche CH07.

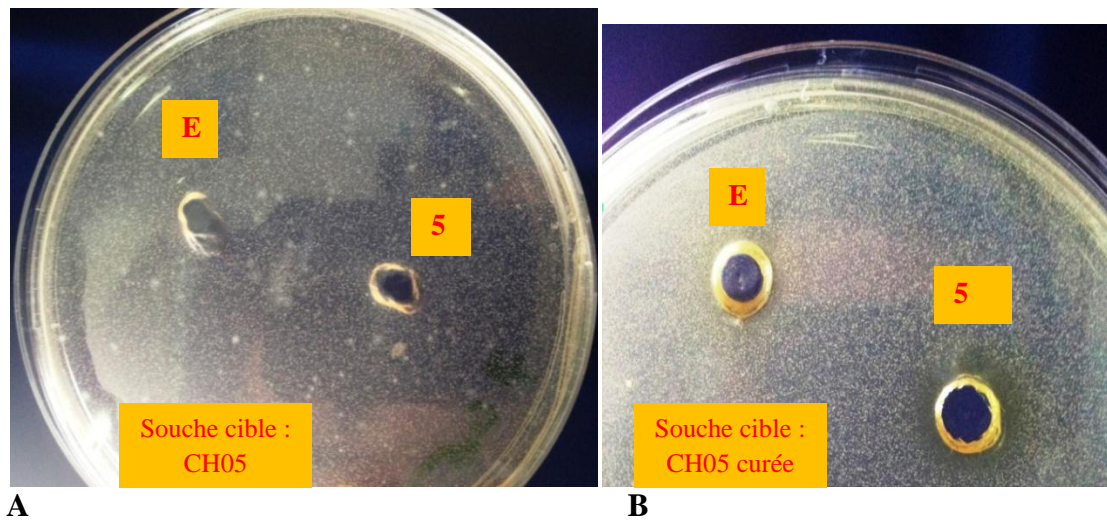
#### 4- Caractérisation génétique de l'immunité aux bactériocines

Les résultats ont montré une apparition d'importantes zones d'inhibition des variant curés par les bactériocines parentales, pour les deux souches : *Lactococcus lactis ssp lactis* CH05 et *Lactococcus lactis ssp raffinolactis* CH07.

Ces résultats indiquent que, chez ces souches, la perte des plasmides portant les gènes de production des bactériocines, s'accompagne de la perte de leur immunité face à leur propres bactériocines. Nous pouvons, donc, conclure que les gènes de production et ceux d'immunité des bactériocines produites par les deux souches CH05 et CH07 sont plasmidiques et co-transcrits.

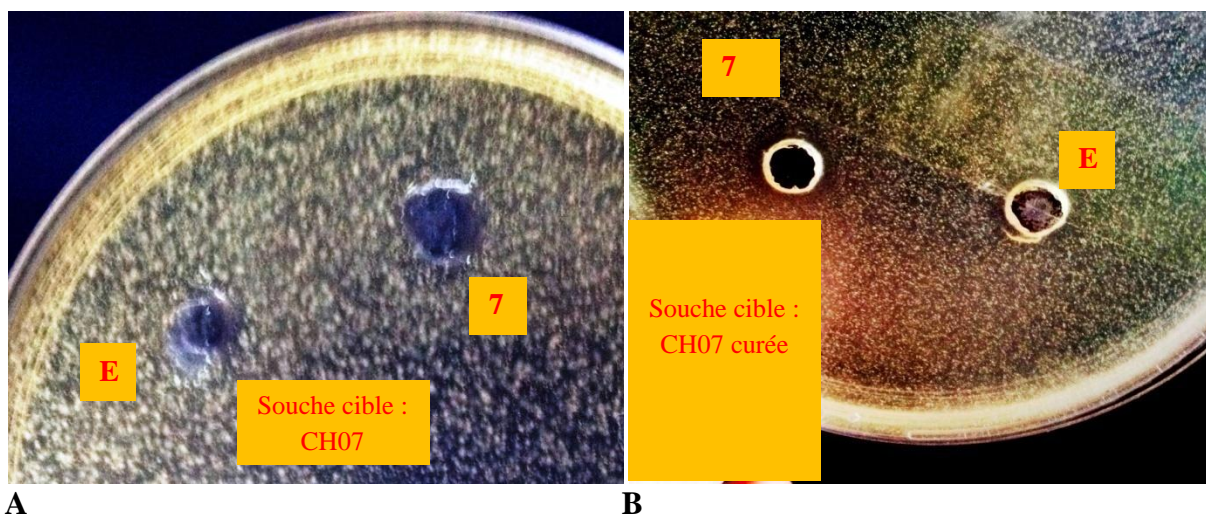
Car, selon ENNAHAR *et al* (2000), le schéma commun d'organisation des systèmes génétiques impliqués dans la biosynthèse, le transport et la régulation de la biosynthèse des bactériocines de classe IIa est constitué de trois groupes de gènes. Un groupe impliqué dans la biosynthèse et l'immunité à la bactériocine, renferme les gènes codant le précurseur de la bactériocine (*B*) et la protéine d'immunité (*I*). Un groupe impliqué dans l'export de la bactériocine renferme les gènes codant un transporteur ABC (*D*), une protéine accessoire (*E*) et parfois une protéine de fonction inconnue (*C*).

Les figures qui suivent illustrent les résultats obtenus :



**Figure 34 :** Immunité de la souche CH05 à sa propre bactériocine (A) et la sensibilité de son variant curé à la bactériocine parentale (B), par la méthode de diffusion sur puits.

E : 70  $\mu$ l d'eau distillée stérile. 5 : 70  $\mu$ l de l'extrait bactériocinique de la souche CH05.



**Figure 35 :** Immunité de la souche CH07 à sa propres bactériocine (A) et la sensibilité de son variant curé à la bactériocine parentale (B), par la méthode de diffusion sur puits.

E : 70  $\mu$ l d'eau distillée stérile. 7 : 70  $\mu$ l de l'extrait bactériocinique de la souche CH07.

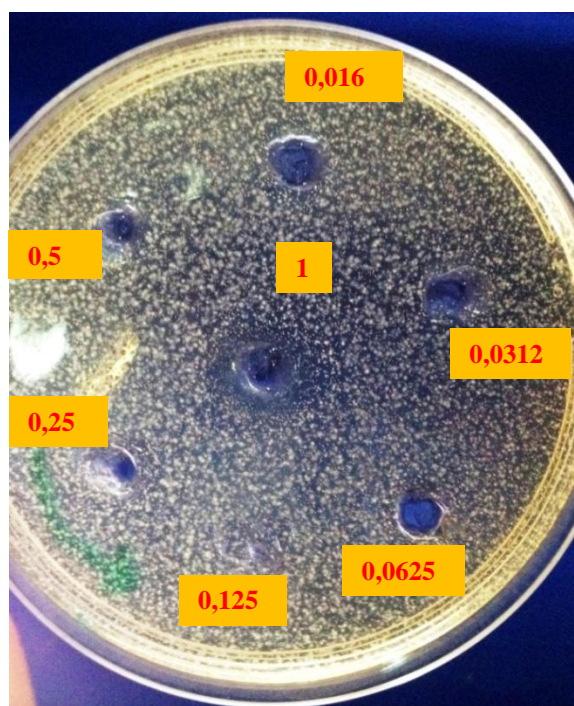
Par la même méthode, l'équipe de KALCHAYANAND (2000), ont montré que les gènes de production de la *brévicine* 9296 et d'immunité de *Lactobacillus brevis* DSM 9296 sont portés par un plasmide, de 11 kpb.

### 5-Détermination des concentrations minimales inhibitrices des bactériocines

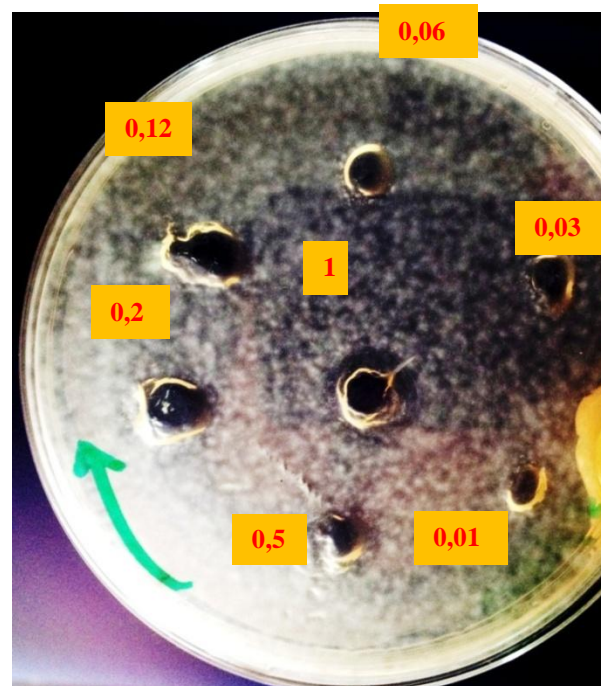
Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont variables selon les espèces bactériennes et les souches (ENNAHAR *et al.*, 2000). Les spectres d'inhibition des bactériocines s'établissent à partir des surnageant de culture ou de préparations semi-purifiées (extraits bactériociniques). Le résultat sera, donc, représentatif de l'activité antibactérienne globale d'une souche et non de l'activité d'une seule bactériocine. Pour cette raison, 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 (SEBTI *et al.*, 2002).

Dans notre cas, l'activité anti-*listeria* a disparu en diluant l'extrait au demi, pour la souche CH05, et en le diluant à  $\frac{1}{4}$  pour la souche CH07. Selon le principe des dilutions critiques, les valeurs des CMI des bactériocines produites par ces souches sont de 14,28 U.A/ml et de 7,14 U.A/ml pour les deux souches, CH05 et CH07 respectivement.

Les figures suivantes illustrent les résultats obtenus :



**Figure 36** : Détermination de la CMI de la suspension bactériocinique de la souche CH05, par la méthode du titrage sur milieu gélosé. Valeurs des dilutions critiques : 1 ; 0,5 ; 0,25 ; 0,125 ; 0,0625 ; 0,0312 ; 0,016.



**Figure 37** : Détermination de la CMI de la suspension bactériocinique de la souche CH07, par la méthode du titrage sur milieu gélosé. Valeurs des dilutions critiques : 1 ; 0,5 ; 0,25 ; 0,125 ; 0,0625 ; 0,0312 ; 0,016.

On remarque que l'activité antibactérienne de la souche CH07 est plus prononcée que celle de la souche CH05, puisqu'à la même dilution (1/2), alors que l'activité de la souche CH05 a disparu, celle de la CH07 persiste. De plus, le pouvoir inhibiteur d'une molécule antimicrobienne est inversement proportionnel à sa CMI (SEBTI *et al.*, 2002 ; IZQUIERDO, 2009).

# Conclusion

## Conclusion

---

Notre travail a porté sur la caractérisation de bactériocines anti-*Listeria* produites par des souches lactiques des genres *Lactococcus* et *Lactobacillus* isolées à partir du lait de chamelle de la région de BISKRA.

Nous avons commencé par l'identification du pouvoir bactériocinogène par la méthode de diffusion des puits, où les quatre souches utilisées, à savoir : *Lactococcus lactis* ssp *lactis* CH05, *Lactococcus lactis* ssp *raffinolactis* CH07, *Lactococcus lactis* ssp *lactis* CH08 et *Lactobacillus brevis/buchnerii* CH15 ont inhibé la croissance de *Listeria innocua* F, une souche cible de référence collectée à l'université de Nantes, avec des zones d'inhibition de 14mm, 13mm, 08mm et 16mm pour les quatre souches respectivement. Les bactériocines produites par les trois souches de *Lactococcus* sont sensibles à l'effet de la trypsine et de la pepsine, deux enzymes protéolytiques les plus utilisées pour la confirmation de la nature protéique des bactériocines.

Par la suite, nous avons réalisé une extraction de ces molécules selon le protocole d'adsorption/désorption de YANG (1992), suivie de leur migration par une SDS-PAGE et d'une révélation biologique par la méthode du zymogramme. Les quatre souches ont donné des profils protéiques et des zones d'inhibition de PM : 8,40KDa, 9,26KDa, 8,47KDa et 9,62KDa pour les quatre souches respectivement. Ces valeurs de PM situées entre 5KDa et 10KDa classent les bactériocines étudiées dans la sous-classe IIa.

Nos résultats sont complétés par une étude génétique ayant pour but de localiser l'emplacement des clusters de production et d'immunité aux bactériocines. A cet effet, nous avons produit des mutants *Bac*<sup>-</sup> (non producteurs de bactériocines) et *Bac* S (sensibles à l'action de la bactériocine parentale) dont les plasmides sont curés, à partir des deux souches CH05 et CH07 et en utilisant deux antibiotiques inhibant la synthèse des acides nucléiques, comme agents curant, à des concentrations sub-inhibitrices. Il s'agit de la *rifampicine* et de la *novobiocine*. La cure plasmidique est vérifiée par l'électrophorèse de l'ADN bactérien, qui a révélé la disparition d'une bande correspondant au plasmide.

La disparition de l'activité anti-*Listeria* et l'apparition de la sensibilité de la souche lactique à sa propre bactériocine, après la cure plasmidique, pour les souches de *Lactococcus* prouve que les gènes codant leurs bactériocines et ceux de l'immunité à ces dernières, sont portés par les mêmes plasmides.

Enfin, nous avons utilisé la méthode des dilutions critiques et le test d'activité par la diffusion sur puits afin de déterminer les CMI des extraits bactériociniques pour les deux souches CH05 et CH07. Les valeurs étaient respectivement de 14,28 U.A/ml et de 7,14 U.A/ml.

En guise de perspectives, il serait intéressant de compléter ce travail par :

- la réalisation d'expérience de conjugaison bactérienne pour estimer le caractère conjugatif des plasmides codant aux bactériocines ainsi que de leur immunité, d'où l'intérêt d'application en génie génétique pour produire des molécules antibactérienne à l'échelle industrielle ;
- la purification des bactériocines par les techniques d'analyses fines : chromatographie d'exclusion moléculaire, chromatographie d'échange d'ions, chromatographie d'interactions hydrophobes, HPLC et d'étude structurale par la spectroscopie de masse et la RMN ;

## Conclusion

---

- séquençage des peptides et détermination des fractions bioactives ;
  - élargir le spectre d'activité antibactérienne, voir même antifongique, vis à vis d'autres pathogènes, notamment alimentaires ;
  - étude de la stabilité des molécules dans les conditions industrielles : pH, température.....etc.
- Ainsi que l'optimisation du rendement de productivité des souches ;
- séquençage des clusters génétiques codant la production et l'immunité de ces biomolécules.

# Références bibliographiques

- AASEN. I. M., MARKUSSEN. S., MORETRO. T., KATLA. T., AXELSSON. L et NATERSTAD. K. (2003).** Interactions of the bacteriocins *sakacin P* and nisin with food constituents. *International Journal o. Food Microbiology*. **87**: 35-43.
- ACHEMCHAM (2004).** Purification et caractérisation d'une bactériocine anti-*Listeria* produite par *Enterococcus faecium* F-420 isolée à partir de lait cru de chèvre. *Biotechnologies*. **47** (2), 384-388.
- ALLOUCHE. F. N., HELLAL. A., LARABA. A. (2010).** Etude de l'activité antimicrobienne de souches de Lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Nature et Technologie*. **3** : 13-20.
- ANDERSON et McKAY (1983).** Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Applied and Environnemental Microbiology*. **46(3)**: 549-552.
- ARIHANA. K., OGIHARA. S. MUKAI. T., ITOH. M and KONDO. Y. (1996).** *Salivacin 140*, a novel bacteriocin from *Lactobacillus salivarius* subsp. *Saliciniius T140* active against pathogenic bacteria. *Letters in Applied Microbiology*. **22(6)** : 420-4.
- AROUS. S., DALET. K. and HECHARD. Y. (2004).** Involvement of the mpo operon in resistance to class IIa bacteriocins in *L. monocytogenes*. *FEMS Microbiology. Letters*. **238**, 37-41.
- ASADUZZAMAN. S. M., and SONOMOTO. K. (2009).** Lantibiotics: diverse activities and unique modes of action. *Journal of Biosciences and Bioengineering*.**107**: 475-487.
- BAUER. R. et DICKS. L. M. T. (2005).** Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *International Journal of Food Microbiology*. **101**: 201-216.
- BAYOUB.K., ELOTTMANI.F., ASSOBEI. O., JAOUA. S., SOUKRI. A (2006).** Contribution à l'étude des bactériocines produites par des souches isolées du lait fermenté traditionnel Raib. *Congrès international de Biochimie, Agadir*.
- BELGUESMIA. Y., NAGHMOUCHI. K., CHIHIB. N. E and DRIDER, D. (2011).** Class IIa bacteriocins: current knowledge and perspectives. In: Drider, D., and Rebuffat, S. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Nantes, France. 1-41.
- BELKADI. B. (2010).** Biologie Moléculaire Microbienne. Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire (LMBM). Université Med V-Agdal. Faculté des sciences BP 1014. Rabat, Maroc.
- BENOIT. V., LEFEBVRE. G. (1996).** La brevicine, une bactériocine produite par *lactobacillus brevis* 27. Thèse nouveau doctorat numéro 96INPL107N. Institut national polytechnique de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, FRANCE.
- BENOMAR. N., GALVEZ. A., ABRIOUEL. H., LUCAS. R. (2005).** Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol. Thèse doctorat. Université de Jaén, 23071 Jaén, Espagne.
- BENKERROUM N., OUBEL H., ZAHAR M., DLLA S. and FILALIMALTOUF. (2000).** Isolation of a bacteriocin producing *Lactococcus lactis subsp lactis* and application to control *Listeria monocytogenes* in Mococcan lben. *Journal of Applied microbiology*. **89**: 960-966.
- BENOMAR. N., GALVEZ. A., ABRIOUEL. H., LUCAS. R. (2010).** Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol. Thèse doctorat. Université de Jaén, 23071 Jaén, Espagne.

**BERTHE. W., MARIKO. E (2008).** Analyse de la dispensation des antibiotiques dans trois officines de BAMAKO. Thèse doctorat d'état en pharmacie. Université de BAMAKO. Faculté de médecine, de pharmacie et d'odonto-stomatologie. BAMAKO. République du MALI.

**BHUGALOO-VIAL. P., DOUSSET. X. METIVIER. A. SOROKIN. O. ANGLADE. P. BOYAVAL. P. And MARION. D. (1999).** Delineation and key amino acid side chains and peptide domains for antimicrobial propertices of *Divercin V41*, a pediocin-like bacteriocin secreted by *Carnobacterium divergens V41*. *Applied and Environnement Microbiology*. **65 (7):** 4410-6.

**BIRRI. D. J., BREDE. D. A., FORBERG. T., HOLO. H and NES. I. F. (2010).** Molecular and genetic characterization of a novel bacteriocin locus in *Enterococcus avium* isolates from Infants. *Applied and Environnement Microbiology*. **76:** 483-492.

**BISHOP. C. J., AANENSEN. D. M. (2009).** Assigning strains to bacterial species via the internet. *In : Etude moléculaire du recrutement des gènes de résistance aux antibiotiques. Simon Tremblay.* Département de biochimie et de microbiologie ; faculté des sciences. Université Laval. Québec.

**BOLTNER. D., MACMAHON. C., PEMBROKE. J. T., STRIKE. P., OSBORN. A. M. (2002).** R391: a conjugative integrating mosaic comprised of phage, plasmid, and transposon elements. *Journal of Bacteriology*. **184:** 5158-69.

**BOUSBIA. H., DOUMANDJI. A., HELLAL. A. (2010).** Effet anti-listeria de *bifidobacterium infantis* isolé à partir de selles de nourrisson allaité au sein. *Sciences & Technologie*. 14-21.

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

**BROWER C.K. and DAESCHEL M.A. (1995).** Influences on the antimicrobial activity of surface-adsorbed nisin. *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology*, **15 (3)**, 227-233.

**BURIANEK. L. L and YOUSEF. A. E. (2000).** Solvent extraction of bacteriocins from liquid cultures. *Letters in Applied Microbiology*. **31 :** 193-197.

**BURRUS., PAVOLOVIC., DECARIS et GUEDON. (2002).** Transmission d'information génétique. Transposon conjugatif ou ICE. *Molecular Microbiology*. **46 :** 601-610.

**CASCALES. E., BUCHANAN. S. K., DUCHE. D., KLEANTHOS. C., LLOUBS. R., POSTLE. K., RILEY. M., SLATIN. S and CAVARD. D. (2007).** Colicin biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*. **71(1):** 158-229.

**CASTANO. S., DESBAT. B., DELFOUR. A., DUMAS. J. M. DA SILVA. A and DUFOURCQ. J. (2005).** Study of structure and orientation of *mesentericin Y105*, a bacteriocin from Gram positive *Leuconostoc mesenteroides*, and its Trp substituted analogues in phospholipids environnements. *Biochemical et Biophysical revews*. **1668 (1) :** 87-98.

**CASTELLANO. P., VIGNOLO. G., FARIAS. R. N., ARRONDO. J. L., CHELIN. R. (2007).** Molecular view by Fourier transforms infrared spectroscopy of the relationship between lactocin 705 and membranes: speculations on antimicrobial mechanism. *Applied and Environnement Microbiology*. **73(2):** 415-420.

**CENATIEMPO. F. (2005).** Influence of Amino Acid Substitutions in the Leader Peptide on Maturation and Secretion of Mesentericin Y105 by *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of Bacteriology* **187:** 2218-2223.

**CHATTERJEE. C., MILLER. L. M., LEUNG. Y. L., XIE, L., YI, M., KELLEHER, N. L., and VAN DER DONK. W. A. (2005).** Lactacin 481 synthetase phosphorylates its substrate during lantibiotic production. *Journal of Chemical Society*. **127:** 15332-15333.

- CHEIKHYOUSSEF. A., CHEIKHYOUSSEF. N., CHEN. H., ZHAO. J., TANG. J., ZHANG. H. (2010).** *Bifidin I*. A new bacteriocin produced by *Bifidobacterium infantis* BCRC 14602: Purification and partial amino acid sequence. *Food protection*. **21**: 746–53.
- CHEMBL. (2010).** Antibacterial activity against  $10^5$  CFU/ml telA-deficient *Listeria monocytogenes* EGD-e Serovar 1/2a after 16 hrs by two fold serial dilution method. *Chemical. Bio assay*. 566-579.
- CHEN P., QI F., NOVAK J., CAUFIELD P.W. (1997).** The specific genes for lantibiotic mutacin II biosynthesis in *Streptococcus mutans* T8 are clustered and can be transferred en bloc. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**, 1356-1360.
- CHEN H. et HOOVER D.G. (2003).** Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*. **2**, 82-100.
- CHEN. Q., HU. J et YUN. X. X. (2006).** Screening, isolation and identification of nisin resistance determinant gene in strains of *Lactococcus lactis*. *Microbiology*. **26**: 839-842.
- CLAESSON, M. J., LI, Y., LEAHY, S. (2006).** Multireplicon genome architecture of *Lactobacillus salivarius*. *Academic Science*. U S A.
- CORR. S. C., LI. Y., RIEDEL. C. U., O'TOOLE. P. W., HILL. C., GAHAN. C. G. M. (2007).** Bacteriocin production as a mechanism for the anti-infective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Academic Science*. USA. **104**: 7617.
- COTTER. P. D., HILL. C. and ROSS. R. P. (2005B).** Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews of Microbiology*. **3**: 777-788.
- COVENTRY. M. J., GORDON. J. B., ALEXANDER. M., HICKEY. W and WAN. J. (1996).** A food grade process for isolation and partial purification of bacteriocins of Lactic Acid Bacteria that uses diatomite calcium silicate. *Applied and Environmental Microbiology*. **62(5)**: 1764-9.
- CRANDALL. A. D and MONTVILLE. T. J. (1998).** Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC700302 is a complex phenotype. *Applied and Environmental Microbiology*. **64 (1)**: 231-7.
- DALE. W. J. (2004).** Molecular genetics of bacteria. *Wiley*. Ed 4. University of Surrey. U.K.
- DALET. K., BRIAND. C., CENATIEMPO. Y and HECHAR. Y. (2000).** The *rpoN* gene of *Enterococcus faecalis* direct sensitivity to subclass IIa bacteriocins. *Current Microbiology*. **41(6)**: 441-3.
- DALET. K., CENATIEMPO. Y., COSSART. P et 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.
- DAWSON. P. L., CARL. G. D., ACTON. J. C and HAN. I. Y. (2002).** Effect of lauric acid and nisin-impregnated soy-based films on the growth of *Listeria monocytogenes* on turkey bologna. *Poultry Science*, **81(5)** : 721-726.
- DEEGAN. L. H., COTTER. P. D., HILL C. and ROSS. P. (2006).** Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*., **16**, 1058-1071.
- DELAHAYE, A. (2009).** Génétique bactérienne. [Arnobio2.com](http://Arnobio2.com).
- DEUTSCHER J.( 2008).** The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Microbiology*. **11**: 87–93.
- DIMARCO J.-L et J. A. HOFFMAN.(2001).** Peptides antimicrobiens: les antibiotiques du futur, *Biofutur*. **212**: 21.
- DIEP. B. D. et NES. I. F. (2002).** Ribosomally synthesis antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Current drug targets*. **3 (2)**: 107-22.

**DIEP. D., SALEHIAN. Z., HOLO. H. and NES. I. F. (2007).** Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocin. *Academic Science*. **104** : 2384-2389.

**DORTU. C. et THONART. P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement. Gembloux agro biotechnologie*. **13** :1.

**DOUGHERTY B.A., HILL C., WEIDMAN J.F., RICHARDSON D.R., VENTER J.C., ROSS R.P. (1998).** Sequence and analysis of the 60 Kb conjugative, bacteriocin- producing plasmid pMRC01 from *Lactococcus lactis* DPC 3147. *Molecular Microbiology*. **47**: 33-42.

**DRIDER. D., FIMLAND. G., HECHARD. Y., MCMULLEN L. M et PREVOST. H. (2006).** The Continuing story of class Ha bacteriocins. *Microbiology and Molecular biomolecule Reviews*. **70**: 564-582.

**DUDLEY, E. G., ABE, C., GHIGO, J. M., LATOUR-LAMBERT, P., HORMAZABAL, J. C. and NATARO, J. P. (2006).** An *IncII* Plasmid Contributes to the Adherence of the Atypical Enteroaggregative *Escherichia coli* Strain C1096 to Cultured Cells and Abiotic Surfaces. *Infectiology and Immunology*. **74**: 2102-14.

**DUFFES. F., JENOE. P and BOYAVAL. P. (2000).** Use of two dimensional electrophoresis to study differential protein expression to divercin V41-resistant and wild-type strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environnement Microbiology*. **66(10)**: 4318-24.

**DUFOUR A., RINCE A., UGUEN P., LE PENNEC J.P. (2000).** IS 1675, a novel lactococcal insertion element, forms a transposon-like structure including the lactacin 481 lantibiotic operon. *Journal of Bacteriology*. **182**, 5600-5605.

**DUQUESNE. S., PETIT. V., PEDUZZI. J and REBUFFAT. S. (2007).** Structural and functional diversity of microcin, gene encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. **13(4)**: 200-9.

**EIJSINK V.G., AXELSSON L., DIEP D.B., HAVARSTEIN L.S., HOLO H. Et NES I.F. (1998).** Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **81(4)**: 639-654.

**EIJSINK. V. G., AXELSON. L., DIEP. D. B., HAVARSTEIN. L. S., HOLO. H., et NES. I. F. (2002).** Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; and example for biological warfar and communication. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **81**: 1-4, 639-54.

**ENNAHAR. S., DESCHAMPS. N and RICHARD. J. (2000).** Natural variation of susceptibility of *Listeria* strain to class IIa bacteriocin. *Current Microbiology*. **41(1)**: 1-4.

**ENNAHAR S.N. et RICHARD J. (2003).** Natural variation in susceptibility of *Listeria* strains to class IIa bacteriocins. *Current. Microbiology*. **41** : 1-4.

**EUZEBY. J. P. (2010).** Sites et modes d'action des antibiotiques. Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale à l'usage des étudiants de L'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Toulouse. France.

**FABRETTI. F., THEILACKER. C., BALDASSARRI. L., KACZYNSKI. Z., KROPEC. A., HOLST. O. and HUEBNER. J. (2006).** Alanine esters of enterococcal lipoteichoic acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides. *Infectiology and Immunology*. **74**: 4164-4171.

**FALLICO V., MCAULIFFE O., FITZGERALD G. F., HILL C., ROSS R. P. (2009).** The presence of pMRC01 promotes greater cell permeability and autolysis in lactococcal starter cultures. *International Journal of Food Microbiology*. **133**: 217-224.

**FANG, J., QUINONES, Q.J., HOLMAN, T.L., MOROWITZ, M.J., WANG, Q., ZHAO, H., SIVO, F., MARIS, J.M., and WAHL, M. L. (2008).** The H<sup>+</sup>-linked monocarboxylate transporter (MCT1/SLC16A1): a potential therapeutic target for high-risk neuroblastoma. *Molecular Pharmacology*. **70**: 2108-2115.

**FIMLAND, G., AXELSSON, L., BRURBERG, M.B., NES, I.F., EIJSINK, V.G., NISSEN-MEYER, J. (2000).** A C-Terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. *Journal of bacteriology*. **182**: 2643-2648.

**FIMLAND G., EIJSINK J.X. and NISSEN-MEYER J. (2002).** Mutational analysis of the role of tryptophan residues in an antimicrobial peptide. *Biochemistry*. **41**: 9508-9515.

**FIMLAND. G., JOHNSEN. L., DALHUS. B and NISSEN-MEYER. J. (2005).** Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. *Journal of Science*.**11**: 688-696.

**FIMLAND. G., PIRNESKOSKI. J., KAWESRICHAN. J. JUTILA. A., KRISTIENSEN. P. E., KINNUNEN. P. K and NISSEN-MEYER. J. (2006).** Mutational analysis and membrane-interactions of the beta-sheet-like N-terminal domain of the pediocin-like antimicrobial peptide *sakacin P*. *Biochemical et biophysical reviews*. **1767(6)**: 1132-40.

**FRANZ C. M., VAN BELKUM. M. J., WOROBO. R. W., VEDERAS. J. C. Et STLLS. M. E. (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 (3)**: 621-31.

**FREMAUX. (2006).** Expression of the Immunity Protein of *Plantaricin 423*, Produced by *Lactobacillus plantarum 423*, and Analysis of the Plasmid Encoding the Bacteriocin. *Applied and Environnement Microbiology*.**72**:7644-7651.

**GALIMAND. M., SABTCHEVA, S., COURVALIN, P., LAMBERT, T. (2005).** Worldwide disseminated *armA* aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. *Antimicrobial Agents Chemother*. **49**: 2949 –2953.

**GALVEZ A., ABRIOUEL H., LOPEZ R.L. & BEN OMAR N. (2007).** Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*. **120(1)**, 51-70.

**GÁLVEZ, A., ABRIOUEL, H., BENOMAR, N., LUCAS. R. (2010).** Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol. *Microbiologie*. Université de Jaén, 23071 Jaén. Espagne.

**GALVAREZ A., ABRIOUEL H., LOPEZ R. L. and OMAR N.B. (2007)** Bacteriocin- based strategies for food bioservation. *International Journal of Food Microbiologie*. **120 (1-2)**:51-70.

**GALVIN. M., HILL. C and ROSS. R. P. (1999).** Lacticin 3147 displays activity in buffer against gram positive bacterial pathogens which appear insensitive in standard plate assays. *Letters in Applied Microbiology*. **28(5)**: 355-8.

**GARNEAU, S., MARTIN, N.I., VEDERAS, J.C. (2002)** Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*. **84(5-6)**: 577-592.

**GAUSSIER. H., MORENCY. H., LAVOIE. M. C et SUBIRADE. M. (2002).** Replacement of trifluoroacetic acid with HCl in the hydrophobic purification steps of pediocin PA-1: a structural effect. *Applied and Environnement Microbiology*. **68**: 4803-4808.

**GAZORI. T., KHOSHAYAND. R., AZIZI. E., YAZDIZADE. P., NOMANI. A. R., HARIRIAN. I. (2009).** Evaluation of alginate/chitosan nanoparticles as antisense delivery vector. *Carbohydrates Polymers*. **77(3)**: 599–606.

- GRANDE M. J., LOPEZ R. L., ABRIOUEL H., VALDIVIA E., BEN OMAR N., MAQUEDA M., MARTINEZ-CANAMERO M. and GALVEZ A. (2007)** Treatment of vegetable sauces with enterocin AS-48 alone or a combination with phenolic compounds to inhibit proliferation of staphylococcus aureus. *Journal of Food Protection*. **70**: 405-11.
- GRAVESEN. A. M., RAMNATH. K. B., RECHINGER. N., ANDERSEN. L., JANSCH Y., HECHARD J., HASTINGS. W. et KNOCHEL. S (2002).** High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology*. **148**: 2361-2369.
- GRAVESEN. A., KALLIPOLITIS. B., HOLMSTROM. K., HOIBY. P. E., RAMNATH. M and KNOCHEL. S. (2004).** Pbp 2229-mediated nisin resistance mechanism in *Listeria monocytogenes* confers cross protection to class IIa bacteriocins and effects virulence gene expression. *Applied and Environmental Microbiology*. **70**(3): 1669-79.
- GRAZIANI. S. (2002).** Caractérisation de gènes impliqués dans le déterminisme de deux modifications contagieuses chez *nectria haematococca*. Thèse Doctorat. Université Paris sud xi. U.F.R. scientifique d'Orsay. France.
- GRIFFITHS et MILLER. (2010).** Introduction à l'analyse génétique, De Boeck, 3<sup>e</sup> édition, Paris, France.
- GRISEMINE. (2002).** [Microbes-edu.org/Espace Etudiant/Cours Bacteriol Gle. Bibliothèque.univ-Lille1.fr](http://Microbes-edu.org/Espace_Etudiant/Cours_Bacteriol_Gle.Bibliothèque.univ-Lille1.fr).
- GRISEMINE. (2006).** [Microbiologie.univ-tours.fr/tp\\_m1\\_UE7\\_5a](http://Microbiologie.univ-tours.fr/tp_m1_UE7_5a). Unité d'enseignement de chimiothérapies anti-infectieuses UE-S7-5a.
- GUINANE. C. M., COTTER. P. D., HILL. C et ROSS. R. P. (2006).** Spontaneous resistance in *Lactococcus lactis* IL1403 to the lantibiotic lactacin 3147. *FEMS Microbiology Letters*. **260**: 77-83.
- GUINANE. C. M., COTTER. P. D., HILL. C., ROSS. R. P and LAWTON. E. M. (2007).** Insertional mutagenesis generates lantibiotic resistance in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. **73**(14): 4677-80.
- HASPER. H. E., KRAMER. N. E., SMITH. J., HILLMAN. J. D., ZACHARIAH. C., KUIPERS. O. P., DE KRUIJFF. B. et BREUKINK. E. (2006).** An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid. *Science*. **313**:1636-1637.
- HAYES. F. (2003).** *Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest*. *Science*. **301**:1496-1499.
- HAYES. M., ROSS. R. P., FITZGERALD. G. F., HILL. C., STANTON. C. (2006).** Casein-derived antimicrobial peptides generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026, *Applied and Environmental Microbiology*. **72**:2260-2264.
- HECHARD. Y., PELLETIER. C., CENATIEMPO. Y et FRERE. J. (2001).** Analysis of  $\sigma^{54}$ -dependent genes in *Enterococcus faecalis*: a mannose PTS permease (EllMan) is involved in sensitivity to a bacteriocin, mesentericin Y105. *Microbiology*. **147**: 1575-1580.
- HECHARD. Y and SAHL. H. G. (2002)** Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie*. **84**: 545-557.
- HERRANZ. C et DRIESSEN. A. J. (2005).** Sec-mediated secretion of bacteriocin enterocin P by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**: 1959-1963.
- HENG. N. C., BURTENSCHAW. G. A., JACK. R. W., and TAGG. J. R. (2007).** Ubericin A, a class IIa bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. *Applied and Environmental Microbiology*. **73**: 7763-7766.

- HENG. H. (2010).** Bacteriocin-like activity of an M-type 25 group A Streptococcus. *Medicine School. 62*: 109–110.
- HUGHES . A. et FRIEDMAN. R. (2002).** Origin and evolution of viral interleukin-10 and other DNA virus genes with vertebrate homologues. *Journal of Molecular Evolution. 54*: 90-101.
- HYINK. O., WESCOMBE. P. A. (2007).** Salivaricin A2 and the novel lantibiotic salivaricin B are encoded at adjacent loci on a 190- kilobase transmissible megaplasmid in the oral probiotic strain *Streptococcus salivarius K12*. *Applied and Environnement Microbiology. 73(4)*: 1107–1113.
- IZQUIERDO (2009).** Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique ; thèse Doctorat ; Université de Strasbourg ; Strasbourg ; France.
- JARLIER (2004).** Résistance aux antibiotiques, rôle du laboratoire de bactériologie. 2<sup>ème</sup> édition. *ONERBA. FRANCE*.
- JASNIEWSKI (2008).** Etude des mécanismes d'action des bactériocines de la sous classe IIa, thèses doctorat, *institut national polytechnique de Lorraine, Nancy, France. 14-15*.
- JOHNSEN, L., FIMLAND, G., MANTZILAS, D., NISSEN-MEYER, J. (2004).** Structure-function analysis of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins: C-terminal parts of immunity proteins are involved in specific recognition of cognate bacteriocins. *Applied and Environnement Microbiology. 70 (5)*: 2647-2652.
- JOHNSON. V., LODEWIJK. S. and KWANG. S. K (2009).** Examination of the Source and Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Contaminating Retail Poultry Meat. Iowa State University's College of Veterinary Medicine and the Alliance for the Prudent Use of Antibiotics (APUA) NIH Grant No. USA.
- JONES, O. A., LESTER, J. N. and VOULVOULIS, N. (2007).** Pharmaceuticals: a threat to drinking water. *Biotechnology, 23*: 163-167.
- JONES. B. V., SUN. F., MARCHESI. J. R. (2010).** Comparative metagenomic analysis of plasmid encoded functions in the human gut microbiome. *BMC Genomics. 1*: 34-77.
- JOOSTEN. H. M. L. J., NUNEZ. M., DEEVREESE. B., BEEUMEN. J. V and MARUGG. J. D (1996).** Purification and characterization of enterocin 4, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* INIA4. *Applied and Environnement Microbiology. 62*: 4220-4223.
- KABADJOVA. P., GOTCHEVA. I., IVANOVA. I and DOUSSET. X. (2000).** Investigation of bacteriocin activity of lactic acid bacteria isolated from Boza. *Biotechnology Equipment. 14*: 56-59.
- KALCHAYANAND (2000).** Purification de la brevicine 9296, établissement de sa structure et localisation de ses déterminants génétiques. Thèse doctorat. Université de Wyoming, Laramie. USA.
- KANEKO. T., NAKAMURA. Y., SATO. S., ASAMIZU. E., KATO. T., SASAMOTO. S., WATANABE. A., IDESAWA. K., ISHIKAWA. A., KAWASHIMA. K., KIMURA. T., KISHIDA. Y., KIYOKAWA. C., KOHARA. M., MATSUMOTO. M., MATSUNO. A., MOCHIZUKI. Y., NAKAYAMA. S., NAKAZAKI. N., SHIMPO. S., SUGIMOTO. M., TAKEUCHI. C., YAMADA. M., TABATA. S. (2000).** Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium*. *DNA Research. 31*: 331-8.
- KARP. (2004).** Biologie cellulaire et moléculaire, DeBoeck, 2<sup>e</sup> édition, Bruxelles, Belgique.
- KIM. S. J and USTUNOL. Z. (2001).** Solubility and Moisture sorption isotherms of wheyprotein-based edible films as influenced by lipid and plasticizer incorporation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49*: 4399-4391.

- KJOS M., NES I. F., DIEP D. B. (2011).** Resistance mechanisms against bacteriocins targeting the mannose phosphotransferase system. *Applied and Environmental Microbiology*. **77**: 3335–3342.
- KOVACS. M., HALFMANN. A., FEDTKE. I., HEINTZ. M., PESCHEL. A., VOLMER. W., HAKENBECK. R and BRUCKNER. (2006).** A functional *dlt* operon, encoding protein required for incorporation of d-alanine in teichoic acid in gram-positive bacteria, confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *streptococcus pneumoniae*. *Journal of bacteriology*. **188(16)**: 5797-807.
- KOUAKOU P. et PHILIPPE. T. (2008).** Enhancing the antilisterial effect of *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 in pork meat and co cultures by limiting bacteriocin degradation. *Meat Science*. **80**: 640-648.
- KRAMER. N. E., VAN HIJUM. S. A., KNOL. J and KUIPERS. O. P. (2006).** Transcriptom analysis reveals mechanisms by which *Lactococcus lactis* acquires *nisin* resistance. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. **50(5)**: 1753-61.
- KRAMER. N. E., HASPER. H. E. VAN DENBOGAARD. T. P., MORATH. S., DE KRUIJF. B., HARTUNG. T., SMID. E. J., BREUKINK. E., KOK. J and KUIPERS. O. P. (2008).** Increased D-Alanylation of lipoteichoic acid and a thickened septum are main determinants in the *nisin* resistance mechanism of *lactococcus lactis*. *Microbiology*. **154(6)**: 1755-62.
- KOUAKOU P. (2008).** Enhancing the antilisterial effect of *L. curvatus* CWBI-B28 in pork meat and co cultures by limiting bacteriocin degradation. *Meat Science*. **80(3)**: 640-648.
- LABIOUI H., ELMOUALDI L., EL YACHIOUI M. et OUHSSINE M. (2005).** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes, *Society of Pharmacia*. **(144)** : 237-250.
- LACHANCE (2000).** Purification et caractérisation d'une bactériocine produite par *lactococcus lactis* ssp. *lactis* mjc15, thèse Doctorat, *faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation*, université Laval. Canada.
- LE PENNEC. J. P., RINCE. A. (1999).** Analyse des déterminants génétiques de la lactococcine DR, une bactériocine produite par une souche de *Lactococcus lactis*. Thèse Doctorat. Université de Rennes 1, Rennes, FRANCE.
- LI. Y., ÁLVAREZ. O. A., GUTTELING. E. W., TIJSTERMAN. M., FU. J. (2006).** Mapping Determinants of Gene Expression Plasticity by Genetical Genomics in *C. elegans*. *PLoS. Genetic*. **2(12)**: 2022.
- LI, C., HEIDT, D.G., DALERBA, P., BURANT, C.F., ZHANG, L., ADSAY, V., WICHA, M., CLARKE, M.F., and SIMEONE, D.M. (2007).** Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Research*. **67**: 1030-1037.
- LIMONET. M., REVOL-JUNELLES. A., MILLIÈRE. J (2002).** Les phénomènes de résistance induites aux bactériocines de bactéries lactiques, *International Journal of food science and technology*. **22(1-2)** : 123-132.
- LIMONET. M. RUVOLL-JUNELEES. A. M., CAILLIEZ-GRIMAL. C and MILLIERE. J. B. (2004).** Synergistic cell lysis induced by a crude bacteriocin. *International Journal of Food Microbiology*. **38(2-3)**: 125-31.

- LUDERS. T., BIRKEMO. G. A., FIMLAND. G., NISSEN-MEYER. J. et NES. I. F. (2003).** Strong synergy between a eukaryotic antimicrobial peptide and bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environnement Microbiology*. **69**: 1797-1799.
- MAKHLOUFI. M., REBUFFAT. S et DRIDER. D. (2011).** Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du Boza. Thèse Doctorat. Université Pierre et Marie CURIE UPMC. Paris. France.
- MAO Y., MURIANA P.M. and COUSIN M.A. (2001).** Purification and transpositional inactivation of Lacticin FS92, a broad-spectrum bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* FS92 ; *Food Microbiology, Food & Agricultural Products ; Center*, Oklahoma State University.
- MARCHESI (2010).** Evolutionary, ecological and biotechnological perspectives on plasmids resident in the human gut mobile metagenome. *Bioengineering*. **3(1)**: 13–31.
- MARTIN-VISSCHER. L. A., SPRULES. T., GURSKY. L. J and VEDERAS. J. C (2008).** Nuclea Magnetic Resonance solution structure of *pisI*, a group B immunity protein that provides protection against the type IIa bacteriocin *piscicolin 126*, *Pis A. Biochemistry*. **47 (24)** : 6427-36.
- MARTÍNEZ. B., CAMPELO. A, B., GASPAR. P., ROCES. C., RODRÍGUEZ. A., KOK. J., KUIPERS. O. P. and NEVES. A. R. (2008).** The Lcn972 Bacteriocin-Encoding Plasmid pBL1 Impairs Cellobiose Metabolism in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environnement Microbiology*. **77(21)**: 7576–7585.
- MATINCA. D., STANILA. L. (2002).** Cahier des travaux pratiques de microbiologie pour l'usage des étudiants en médecine, Ed. Médicale Universitaire Iuliu Hațieganu, Cluj.
- MC AULIFFE O. & HILL C. (2001a).** Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Review*. **25** : 285-308.
- MCENTIRE. J. C., CARMAN. G. M., et MONTVILLE. T. J. (2004).** Increased ATPase activity is responsible for acid sensitivity of nisin-resistant *Listeria monocytogenes* ATCC 700302. *Applied and Environnement Microbiology*. **70**: 2717-2721.
- MEDRAOUI. L. (2012).** Biologie du gène. TD biologie moléculaire TDI4. Rabat. Maroc.
- MERZOUG. M., DALACHE. F., ZADI. K. H., KARAM. N. (2010).** Localisation du déterminant génétique de la lactococcine GHB15 produite par *lactococcus lactis ssp diacetylactis GHB15*. Thèse de Doctorat. Département de biologie, Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie, Université de Mostaganem.
- MIKKELSEN. S. R et CORTON. E (2004).** Nomogramme pour l'estimation des concentrations des acides nucléiques et des protéines dans des mélanges. *Bioanalytical Chemistry*. 95.
- MILLER. K. W., SCHAMBER. R., CHEN. Y and RAY. B. (1998).** Production of active chimeric *Pediocin AcH* in *Escherichia Coli* in the absence of processing and secretion genes from the *pediococcus pap operon*. *Applied and Environnement Microbiology*. **64(1)** : 14-20.
- MILLETTE. M., DUPONT. C., SHAREK. F., RUIZ. M. T., ARCHAMBAULT. D., LACROIX. M. (2008).** Purification and identification of the pediocine produced by *Pediococcus acidilactici* MM33, a new human intestinal strain. *Journal of Applied Microbiology*. **104**: 269–75.
- MILLS. S, MARIELA. L. S., GRIFFIN. C., M O'CONNOR. P., SCHAAD. G, BRUINING. C., HILL. C., PAUL. R., MEIJER. W. C. (2011).** Inhibitory activity of *Lactobacillus plantarum* LMG P-26358 against *Listeria innocua* when used as an adjunct starter in the manufacture of cheese. From 10th Symposium on Lactic Acid Bacterium. *Microbial Cell Factories*. Egmond aan Zee. Netherlands.

- MIRDAMANI. S., AGHAGHAZVINI. S., EHSANI MR., FALAHPOUR. M, TAFRESHI. S. H. (2008).** Inhibitory efficacy of *Lactococcus lactis* on food borne pathogens and food spoilage bacteria. *Journal of Biotechnology*. **136(1):**48.
- MORENCY. H., MOTA MEIRA. M., LA POINTE. G., LA CROIX. C and LAVOI. M. C. (2001).** Comparaison of the activity spectra against pathigens of bacterial strains producing a mutacin or a lantibiotic. *Canadian Journal of Microbiology*. **47(4):** 322-31.
- MORGAN. S.M. et al.(2005).** Sequential actions of the two component peptides of the lantibiotic lacticin 3147 explain its antimicrobial activity at nanomolar concentration. *Antimicrobial Agents Chemother.* **49(7):** 2606-2611.
- MORISSET. D and FRERE. J. (2005).** Heterologous expression of bacteriocins using the *mesentericin Y105* dedicated transport system by *Leuconostoc mesenteroides*. *Biochimie.* **84(5-6):** 569-576.
- MOTA-MEIRA. M., LAPOINTE. G., LACROIX. C et LAVOIE. M. C. (2000).** MICs of mutacin B<sub>Ny266</sub>, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens. *Antimicrobial Agents Chemother.* **44:** 24-29.
- MUGOSHI. T., NANDAKUMAR. M. P., ZVAUYA. R and MATTIASSON. B. (2001).** Bioassay for the rapid detection of bacteriocin in fermentation broth. *Biotechnology Letters*. **23(15):** 1243-1247.
- NAGHMOUCHI, K., DRIDER, D., KHEADR, E., LACROIX, C, PREVOST, H. et FLISS, I. (2006).** Multiple characterizations of *Listeria monocytogenes* sensitive and insensitive variants to *divergicin M35*, a new pediocin-like bacteriocin. *Journal of Applied Microbiology*. **100:** 29-39.
- NASCIMENTO J. S., H. CEOTTO, S. B. NASCIMENTO, M. GIAMBIAGI-DEMARVAL, K. R. Santos et M. C. Bactos. (2005).** Bacteriocins as alternative agents for control of multiresistant staphylococcal strains. *Letters Applied Microbiology*. **42:** 215-221.
- NES. I. F., DIEP. D. B. and HOLO, H. (2007).** Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Bacteriology*. **189:** 1189-1198.
- NEVES A. R., POOL W. A., KOK J., KUIPERS O. P., SANTOS H.(2005).** Overview on sugar metabolism and its control in *Lactococcus lactis*—the input from in vivo NMR. *FEMS Microbiology Review*. **29:** 531–554.
- NICHOLAS. G., HOUSDEN S., LOFTUS. R., GEOFFREY. R., RICHARD. J and KLEANTHOS. C. (2005).** Cell entry mechanism of enzymatic bacterial colicins: Porin recruitment and the thermodynamics of receptor binding. Institute of Infection, Immunity, and Inflammation, Centre for Biomolecular Sciences, University of Nottingham, Nottingham NG7 2RD, United Kingdom. **102(39):** 13849–1385.
- NILSEN. T., NES. I. F. and HOLO. H. (2003).** Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG2333. *Applied and Environnement Microbiology*. **69(5):** 2975-2984.
- NILSSON. L., NG. Y.Y., CHRISTIANSEN. J.N., JORGENSEN. B. L., GROTH. D., GRAM. L. (2004).** The contribution of bacteriocin to inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium piscicola* strains in cold-smoked salmon systems. *Journal of Applied Microbiology*. **96:** 133-143.
- NISSEN-MEYER J., ROGNE. P., OPPEGÅRD. C., HAUGEN. H. S and KRISTIANSEN. P. E. (1992).** Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. **10:** 19-37.

- NISSEN-MEYER. J., ROGNE. P., OPPEGÅRD. C., HAUGEN. H. S., and KRISTIENSEN, P. E. (2009)** Structure–function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Current Pharmaceutical Biotechnology*.**10**: 19-37.
- NUNEZ. M., TOMILLO. J., GAYA. P and MEDINA. M. (1996).** Bacteriocin quantification by the critical dilution method: a comparison with arbitrary units with diameters and area of the zone of growth inhibition. *Milchwissenschaft. Milk science International*. **51**, 7-10.
- OGUNBANWO S.T., SANNI A.I. et ONILUDE A.A. (2003).** Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *African Journal of Biotechnology*. **2(8)**: 219-227.
- ONDA T., FUJITOSHI Y., MASAO T., TAKASHI S., KOKI Y. (2002).** Production and purification of a bacteriocin peptide produced by *Lactococcus* sp. Strain GM005, isolated from Miso-paste; *International journal of food Microbiology*; ELSEVIER, Yamanashi, Japan.
- OPPEGARD C. et al. (2007).** The two-peptide class II bacteriocins: structure, production and mode of action. *Journal of Molecular Microbiology. Biotechnology*. **13(4)** : 210-219.
- OSCARIZ. J. C et PISABARRO. A. G. (2001).** Classification and mode action of membrane active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *International Microbiology*. **4**: 13-19.
- O'SULLIVAN. L., RYAN. M. P., ROSS. R. P et HILL. C (2003).** Generation of food-grade lactococcal starters which produce the antibiotics lactacin 3147 and lactacin 481. *Applied Environnement of Microbiol.* **69**: 3681-3685.
- PAOLETTI. R., NICOSIA. S., CLEMENTI. F., FUMAGALI. G. (2003).** Pharmacologie générale et moléculaire, 2<sup>ème</sup> Edition, UTET, Turin.
- PAPAGIANI, M. (2003).** Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnology Advanced*. **21**: 465-499.
- PATTON. G. C and VAN DER DONK. W. A. (2005).** New developments in antibiotic biosynthesis and mode of action. *Current Microbiology*. **8**: 543-551.
- PEDULLA. M. L., FORD. M. E., HOUTZ. J. M., KARTHIKEYAN. T., WADSWORTH. C., LEWIS. J. A., JACOBS-SERA. D., FALBO. J., GROSS. J., PANNUNZIO. N. R., BRUCKER. W, KUMAR. V., KANDASAMY. J., KEENAN. L., BARDAROV. S., KRIAKOV. J., LAWRENCE. J. G., JACOBS. W. R. JR., HENDRIX. R. W., HATFULL. G. F. (2003).** Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes. *Cell*. **113**: 171-82.
- PENFOLD. C. N., HEALY. B., HOUSDEN. N. G., BOETZEL. R., VANKEMMELBEKE. M., MOORE. G. R., KLEANTHOS. C and JAMES, R. (2004).** Genom of *Lactococcus*. *Journal of Bacteriology*. **186**, 4520–4527.
- PERRETEN, V., F. SCHWARZ, L. CRESTA, M. BOEGLIN, G. DASEN et M. TEUBER.(1997).** Antibiotic resistance spread in food. *Nature*. 389: 801-802.
- PHELPS. H. A., NEELY. M. N. (2007).** SalY of the *Streptococcus pyogenes* antibiotic locus is required for full virulence and intracellular survival in macrophages. *Infectiology and Immunology*. **75 (9)**: 4541–4551.
- PHILIP A. WESCOMBE. N. HENG JEREMY. K., BURTON. L., JOHN. R., TAGG. N. (2010).** Something Old and Something New: An Update on the Amazing Repertoire of Bacteriocins Produced by *Streptococcus salivarius*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. **2**:37–45.
- PHILIPPON. A, PROTS. L. (2002).** Cours de bactériologie générale, les principes de classification des organismes vivants et la place des procaryotes, Transposons, *Cochin- port-Royal*, 1<sup>ère</sup> édition. PARIS V. France. 56.

- PHUONG. N., MAY-FARAH. M., ISABELLE. A., ZOLALAINA. R., DEGRAEVE. P., CORALIE. D., LIGNITTO. L., NOVELLI. E., SEGATO. S., DONG. P. ET OULAHAL. N. (2009).** Présence de composés inhibant la croissance de *Listeria innocua* dans un fromage italien, l'Asiago d'allevato. *Bio-ingénierie et dynamique microbienne aux interfaces alimentaires*. Université de Lyon. rue Henri de Boissieu, 01000 Bourg en Bresse. Lyon. France.
- PIARD J.C., MURIANA P.M., DESMAZEAUD M. & KLAENHAMMER T.R. (1992).** Purification and partial characterization of lacticin 481, IX lanthioninecontaining bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. *Applied and Environmental Microbiology*. **58** : 279-284.
- PRENTE. E., BRIEBZA. C., MOLES. M and RICIARDI. A. (1995).** A comparison of method of measurement of bacteriocin activity. *Journal of Microbiological method*. **22** : 95-108.
- PHILIPPON et PROTS. (2002).** Définition, classification et nomenclature des bactéries. Cours de bactériologie générale. *Espace étudiant*. Université Lille 1. France.
- RAISONNIER. A., ETIENNE. J et LUCOTTE. G. (2007).** Biologie génique. Université Paris-VI. 3<sup>ème</sup> édition. Faculté de médecine Pierre et Marie Curie. Paris, France.
- RAMNATH. M., BEUKS. M., TAMURA. K and HASTINGS. J. W. (2000).** Absence of a putative mannose-specific phosphotransferase system enzyme IIAB component in a leucine 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.
- RAMNATH. M., BEUKES. M., TAMURA. K et HASTINGS. J. W. (2002).** 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-polycarylamide gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**: 3098-3101.
- RAMNATH, M., AROUS. S., GRAVESEN. A., HASTINGS. J. W et HECHARD. Y. (2004).** Expression of *mptC* of *Listeria monocytogenes* induces sensitivity to class IIa bacteriocins in *Lactococcus lactis*. *Microbiology* **150**: 2663-2668.
- RICHARD. C., BRILLET. A., PILET. M. F., PREVOST. H., DRIDER. D. (2003).** Evidence on inhibition of *Listeria monocytogenes* by divercin V41 action. *Letters in Applied Microbiology*. **36**: 288-292.
- RICK. C. (2005).** Mesure cellule par cellule du nombre de copies de plasmide chez *Escherichia coli*. Thèse Doctorat. Université Strasbourg I. France.
- ROCES C. (2009).** Contribution of the CesR-regulated genes *llmg0169* and *llmg2164-2163* to *Lactococcus lactis* fitness. *International Journal of Food Microbiology*. **133**: 279-285.
- RODGERS. S. (2004).** Novel approaches in controlling safety of cook-chill meals. *Trends Food Science and Technology*., **15**: 366-372.
- RUSSELL. J.B and MANTOVANI. H.C. (2001).** The bacteriocins of ruminal bacteria and their potential as an alternative to antibiotics. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. **4**: 347-355.
- RYAN M.P., MEANEY W.J., ROSS R.P. and HILL C. (1998)** Evaluation of lacticin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**: 2287-2290.
- SABOURANGA. B. A (2007).** Etude des Mutacines, Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval dans le cadre du programme de maîtrise en Microbiologie-immunologie pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Se.), département d'anatomie physiologie faculté de médecine université Laval Québec. **19-22**.

- ŞAHINGİL. D., ISLEROĞLU. H., YILDIRIM. Z., AKÇELİK. M and YILDIRIM. M. (2009)** Characterization of lactococcin BZ produced by *Lactococcus lactis subsp. lactis* BZ isolated from Boza. *Microbiology*. **1**:45-69.
- SCHAGGER H., VON JACOW G. (1987).** Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal of Biochemistry*. **166**: 368– 379.
- SCHÖBITZ. R., SUAZO. V., COSTA. M. CIAMPI. L. (2003).** Effects of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Carnobacterium piscicola* against human and salmon isolates of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. **84** : 237-244.
- SEBTI. I. (2002).** Bio-emballage actif incorporant la Nisine, diffusion de cette bactériocine en gel d'agarose. Thèse Doctorat. Université Bordeaux I. France.
- SERVIN A. L. (2004).** Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens, *FEMS Microbiology Review*. **4**: 405 - 409.
- SIMON. L., FREMAUX. C., CENATIEMPO. Y and BERJEAUD. J. M. (2002).** Sakacin G, a new type of antilisterial bacteriocin. *Applied and Environnement Microbiology*. **68**: 6416-6420.
- SIMOVA E.D., BESHKOVA D.M., ANGELOV M.P. et DIMITROV Z.P. (2008).** Bacteriocin production by strain *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* BB18. *Journal of Bacteriology*. **5**: 13-21.
- ŠMAJS. D., STROUHAL. M., MATĚJKOVÁ. P., ČEJKOVÁ. D., CURSINO. L., CHARTON-SOUZA. E. (2008).** Complete sequence of low-copy-number plasmid MccC7-H22 of probiotic *Escherichia coli* H22 and the prevalence of mcc genes among human *E. coli*. *Plasmid*. **59**: 1–10.
- SPRULES. T., KAWULKA. K. E and VEDERAS. J. C. (2004).** NMR solution structure of ImB2, a protein conferring immunity to antimicrobial activity of the type IIa bacteriocin, carnobacteriocin B2. *Biochemistry*. **43**: 11740-11749.
- STANILA. L. (2003).** Bactériologie générale et virologie à l' usage des étudiants en médecine, médecine dentaire et pharmacie, Ed. *Médicale Universitaire Iuliu Hațieganu*, ISBN 973-8385.
- STEIN. L. D., BAO. Z., BLASLAR. D., BLUMENTHAL. T., BRENT. M. R. (2003).** The Genome Sequence of *Caenorhabditis briggsae*: A Platform for Comparative Genomics. *PLoS Biology*. **1(2)**: 45.
- STRAUME. D., KJOS. M., NES. I. F and DIEP. D. B. (2007).** Quorum-sensing based bacteriocin production is down-regulated by N-terminally truncated species of gene activators. *Molecular Genetics and Genomics*. **278**: 283-293.
- SUZUKI. M., YAMAMOTO. T., KAWAI. Y., INOUE. N et YAMAZAKI. K. (2005).** Mode of action of pisciocin CS526 produced by *Carnobacterium piscicola* CS526. *Applied Microbiology*. **98**: 1146-1151.
- TAGG, J. R., JACK. R. W, HENG N. C. et HAIE. J. D. (2005).** Identification of *ofnlmTE*, the locus encoding the ABC transport System required for export of nonlantibiotic mutacins in *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology*. **187**: 5036-5039.
- TAHIRI. I., DESBIENS. M., KHEADR. E., LACROIX. C., FLISS. I. (2009).** Comparison of different application strategies of divergicin M35 for inactivation of *Listeria monocytogenes* in coldsmoked wild salmon. *Food Microbiology*. **26**, 783-793.

- TAKALA. H., NURMINEN. E., NURMI. S. M., AATONEN. M., STRANDIN. T., TAKATALO. M., KIEMA. T., GAHMBERG. C. G., YLÄNNE. J. and FAGERHOLM. S. C. (2006).** Integrin beta2 phosphorylation on Thr758 acts as a molecular switch to regulate 14-3-3 and filamin binding. *Blood Biology*. **112**: 1853-1862.
- TANG, A.H., NEUFELD, T.P., RUBIN, G.M., MULLER, H.A.J. (2001).** Transcriptional regulation of cytoskeletal functions and segmentation by a novel maternal pair-rule gene, lilliputian. *Development*. **128(5)**: 801--813.
- TESSEMA G. T., MORETRO T., SNIPEN L., AXELSSON L., NATERSTAD K. (2011).** Global transcriptional analysis of spontaneous sakacin P-resistant mutant strains of *Listeria monocytogenes* during growth on different sugars. *Journal of Bacteriology*. **16**: 192.
- TODOROV. S. D. (2010).** Diversity of bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from Boza, a cereal-based fermented beverage from Bulgaria. *Food Control*. **21**: 1011-1021.
- TRAUTNER, B. W., R. A. HULL et R. O. DAROUICHE. (2005).** Colicins prevent colonization of urinary catheters. *Journal of Antimicrobial Chemother*. **56**: 413-415.
- TWOMEY, D., R. P. ROSS, M. RYAN, B. MEANEY et C. HILL. (2002).** Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie van Leeuwenhoek*. **82**: 165-185.
- VADYVALOO. V., HASTINGS. J. W., VAN DER MERWE. M. J and RAUTENBACH. M. (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., SNOEP. J. L., HASTING. J. W and RAUTENBACH. M. (2004).** Physiological implications of class IIa bacteriocin resistance in *L. monocytogenes* strains. *Microbiology*, **150**: 335-340.
- VAN BELKUM M.J., WOROBO R.W., STILES M.E. (2000).** Double-glycin-type leader peptides direct secretion of bacteriocins by ABC transporters: colicin V secretion in *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology*. **23**: 1293-1301.
- VAN MELDEREN. L., DE BAST. M. S. (2005).** Bacterial toxin-antitoxin systems: More than selfish entities. *PLoS Genetic journal*. **5**: 56.
- VAN REENEN. C. A., VAN ZYL. W. H. Et DICKS. L. M. T. (2006).** Expression of the Immunity Protein of Plantaricin 423, Produced by *Lactobacillus plantarum* 423, and Analysis of the Plasmid Encoding the Bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*. **72 (12)** : 7644-7651.
- VIGNOLO. G. M., KAIRUZ. M. N. D., KOLGADO. A. A. P. D. R and OLIVIER. G. (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.
- WATSON. J., BAKER. T., BELL. S., GANN. A., LEVINE. M et LOSICK. R. (2009).** Biologie moléculaire du gène. Ed Pearson edutaion. 47 bis, rue des vinaigriers, 75010 Paris, France.
- WESCOMBE. P. A., BURTON. J. P. (2006).** Megaplasms encode differing combinations of lantibiotics in *Streptococcus salivarius*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **90 (3)**: 269–280.
- WESSLER. S., GRIFFITHS. A., LEWENTIN. R et CAROLL. S. (2010).** Introduction à l'analyse génétique. 5<sup>ème</sup> édition. Groupe de Boeck s.a. Rue des Minimes 39, B-1000 Bruxelles.
- WIDDICK. D. A., DODD. H. M., BARRAILLE. P., WHITE. J., STEIN. T. H., CHATER. K. F., GASSON. M. J., and BIBB. M. J. (2003).** Cloning and engineering of the cinnamycin

biosynthetic gene cluster from *Streptomyces cinnamoneus* DSM 40005. *Academy of Science. USA.* **100**: 4316-4321.

**WIEDEMANN. I., BÖTTIGER. T., BONELLI. R. R., WIESE. A., HAGGE. S.O., GUTSMANN. T., SEYDEL. U., DEEGAN. L., HILL. C., ROSS. P., SAHL. H.G. (2006).** The mode of action of the lantibiotic *lacticin 3147* - a complex mechanism involving specific interaction of two peptides and the cell wall precursor lipid II. *Molecular Microbiology.* **61(2)**: 285-296.

**WILLEY J.M. & VAN DER DONK W.A. (2007).** Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annual Review of Microbiology.* **61**: 477-501.

**XUE. J., HUNTER. I., STEINMETZ. T. PETERS. A., RAY. B and MILLER. K. W. (2005).** Novel activator of mannose-specific phosphotransferase system permease expression in *Listeria innocua*, identified by screening for *pediocin AcH* resistance. *Applied and Environmental Microbiology.* **71(3)**: 1283-90.

**YAKOUBI K., AMMOR S., HAYDERSAH J. & CHEVALLIER I. (2006).** Activités antibactériennes des bactéries lactiques isolées d'ateliers fermiers de salaison. Typicité des Produits Alimentaires, ENITA, **11**, 168-175.

**YAMAZAKI. K., SUZUKY. M., KAWAI. Y., INOUE. N., MONTVILLE. T.J. (2003).** Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon by *Carnobacterium piscicola* CS526 isolated from frozen surimi. *Journal of Food Protection.* **66**, 1420-1425.

**YAMAZAKI. K., SUZUKI. M., KAWAI. Y., INOUE. N., MONTVILLE. T.J. (2005).** Purification and characterization of a novel class IIa bacteriocin, pisciocin CS526, from surimi-associated *Carnobacterium piscicola* CS526. *Applied and Environment Microbiology* **71**, 554-557.

**YAN. L. Z., GIBBS. A. C., STILES. M. E., WISHART. D.S. Et VEDERAS. J. C. (2000).** Analogues of bacteriocins: antimicrobial specificity and interactions of leucocin A with its enantiomer, carnobacteriocin B2, and truncated derivatives. *Journal of Medical Chemistry.* **43**: 4579-4581.

**YANG. R., JOHNSON. M. C and RAY. B. (1992).** Novel method to extract large amounts of bacteriocin from lactic acid bacteria. *Applied Environnement of Micrbiology.* **58**: 3355-3359.

**YANN. C. (2005).** A Crystal Structure of EntA-im: A Bacterial Immunity Protein Conferring Immunity to the Antimicrobial Activity of the Pediocin-Like Bacteriocin Enterocin A. *Journal of Biological Chemistry.* **280**:19045-19050.

**YEAMAN, R. M et N. Y. YOUNT. (2003).** Mechanisms of antimicrobial peptide action and résistance. *Pharmacology Review.* **55**: 27-55.

**YILDIRIM Z. and YILDIRIM M. (2001).** Characterization of buchnericin lb produced by *Lactobacillus buchneri* LB. *Turkish Journal of Biology.* **25**: 73-82.

**YUSENKOVA. J., DELGADO. M., NECHAEV. S., SAVALIA. D., EPSTEIN. V., ARTSIMOVICH. I., MOONEY. R. A., LANDICK. R., FARIAS. R. N., SALOMON. R and SEVERINOV. K. (2002).** Mutations of bacterial ARN-polymerase leading to resistance to *microcin J25*. *Journal of Biological Chemistry.* **277(52)**: 50867-75.

**ZHANG. W., QI. W., ALBERT. T. J., MOTIWALA. A. S., ALLAND. D., HYYTIA-TREES. (2010).** E. K. Probing genomic diversity and evolution of *Escherichia coli* O157 by single nucleotide polymorphisms. *Genome Research.* **16**: 757-67.

**ZOUHIR. A., HAMMAMI. R., FLISS. I. and HAMIDA. J. B. (2010).** A new structure-based classification of gram-positive bacteriocins. *Protein Journal.* **29**: 432-439.

[www.molecularstation.com/fr/protocol-links/Microbiology/Mini-Prep-Plasmid-Purification](http://www.molecularstation.com/fr/protocol-links/Microbiology/Mini-Prep-Plasmid-Purification).

# ANNEXES

## **Annexe 1 : listes du Matériel et réactifs utilisés.**

### **1-Verrerie**

- Fiole graduée à 1 litre.
- Fioles stériles graduées à 250ml.
- Flacons de 250ml.
- Béchers, Erlen-meyer.
- Pipettes graduées à 1ml, 2ml, 5ml et 10ml.
- Eprouvettes de 10ml et de 30ml.
- Entonnoir stérile.
- Tubes à essais stériles.
- Boîtes en verre

### **2-Réactifs et colorants**

- Eau distillée stérile.
- Huile de vaseline stérile.
- Enzymes protéolytiques sous forme lyophilisée: Trypsine et Pepsine.
- Polyacrylamide 30%.
- Bleu de Coomassie G250.
- Glycérol 80%.
- Solution de sérum albumine bovine (BSA) à 0,1mg/ml.
- SDS.
- Gel Buffer à pH 8,45.
- Tween 20.
- Tween 80.
- Solution de fixation.
- Solution de coloration et solution de décoloration.
- Tampon d'électrophorèse 1X.
- Solution de dénaturation (Tampon de charge non réducteur).
- Tampon PBS 0,1M à pH 6.
- Solution mère de Rifampicine à 1g/l.
- Solution mère de Novobiocine SIGMA à 400 µg/ml.
- Solution de désorption à pH 1,4.
- Solution de bromure d'éthidium SIGMA 0,2 µg/ml.
- Gel d'agarose 0,6 %.
- Saccharose 6,7% - Tris 50mM – EDTA 1mM, pH8,0.
- Lysozyme 25mg/ml dans Tris 25mM, pH8,0.
- EDTA 0,25M – Tris 50mM, pH8,0.
- SDS 20% dans Tris 50mM – EDTA 20mM, pH8,0.
- NaOH 3M.
- Tris 2,0M – HCl, pH7,0.
- NaCl 5,0M.
- Phénol saturé (90%) avec une solution de NaCl 3%.
- Chloroforme – Alcool iso amylique (24/1 v/v).
- Tris 10 mM – EDTA 1mM, pH7,5.

- Solution de dépôt : Bleu de Beomophénol 0,5% ; EDTA 10mM ; SDS 3% ; Glycérol 50%, dans l'eau.
- Solution de visualisation : Bromure d'éthidium à 2µg/ml.
- Tampon d'électrophorèse de l'ADN : Tris-acétate à 40 mM de Tris ; 20mM d'acétate de Na et 2mM d'EDTA, pH8,1.
- Isopropanol.

### 3-Milieus de culture

- Bouillon MRS (HI-MEDI Laboratoires, Mumbai, India).
- Bouillon Elliker.
- Bouillon BHIB.
- Bouillon Nutritif enrichi.
- Gélose Elliker à 0,9% d'agar.
- Gélose Nutritive enrichie à 0,9% d'agar.
- Gélose Nutritive enrichie à 1,5% d'agar.

### 4-Autres matériels

- Bec bunsen, boîte pétri.
- Pipettes Pasteur.
- Anse Pasteur à boucle et à file droit.
- Pince, spatule, scalpel.
- Tube éppendorf.
- Filtres de membrane CA-MEMBRANE 0,20 µm.

## Annexe 2: Composition des réactifs et des colorants

### Solution de bleu de bromophénol

- Bleu de Bromophénol.....2 mg.
- Glycérol 50%.....10 g.
- Tris HCl 0.5M pH 6.8.....1.25 ml.
- H<sub>2</sub>O.....qsp 10 ml.

### Tampon d'électrophorèse des protéines 5X + SDS

- Tris .....15 g.
- Glycine.....72 g.
- H<sub>2</sub>O.....qsp 1L.

### PBS 10X

- NaCl.....76.5 g.
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....7.25 g.
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....2.1 g.
- H<sub>2</sub>O.....qsp 1 L.

### **Solution d'HCl (0,02M, pH 2)**

- pipeter 110µl d'HCl 32% ;
  - ajuster à 50ml par de l'eau distillée
- Le pH est de 2.

### **Solution de PBS (0,1M ; pH6)**

- KCl .....0,7g.
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> .....0,9g.
- NaCl.....26,7 g.
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....14,2 g.

### **Solution de fixation :**

- TCA.....12g.
- Eau distillée.....100ml.

### **Solution de coloration :**

- Bleu de Coomassie R250.....0,5g.
- TCA.....4g.
- Méthanol.....100ml.
- Eau distillée.....100ml.

### **Solution de décoloration :**

- Acide acétique.....37,5ml.
- Eau distillée.....312,5ml.
- Méthanol.....150ml.

### **Annexe 3 : Composition des réactifs utilisés pour l'extraction de l'ADN bactérien :**

#### **-Saccharose 6,7% - Tris 50mM – EDTA 1mM, pH8,0 :**

- Saccharose .....1,34g.
  - Tris-base .....0,12g.
  - EDTA .....0,006g.
  - Eau distillée .....qsp 20ml.
- pH8,0.

#### **-Lysozyme 25mg/ml dans Tris 25mM, pH8,0 :**

- Tris-base .....0,06g.
  - Eau distillée qsp .....20ml.
  - Lysozyme .....0,5g.
- pH8,0.

**-EDTA 0,25M – Tris 50mM, pH8,0 :**

-EDTA .....1,46g.  
-Tris .....0,12g.  
-Eau distillée .....qsp 20ml.  
pH8,0.

**-SDS 20% dans Tris 50mM – EDTA 20mM, pH8,0 :**

-Tris .....0,12g.  
-EDTA .....0,006g.  
-Eau distillée qsp .....20ml.  
-SDS .....4g.  
pH8,0.

**-NaOH 3,0 M :**

-NaOH .....2,4g.  
-Eau distillée qsp .....20ml.

**-Tris 2,0 M – HCl, pH7,0 :**

-Tris .....4,84g.  
-Eau distillée .....qsp 20ml.  
pH7,0.

**-NaCl 5,0M :**

-NaCl .....5,84g.  
-Eau distillée .....qsp 20ml.

**-Phénol saturé avec une solution de NaCl 3% :**

-Préparation d'une solution NaCl 30% :

-NaCl .....6g.  
-Eau distillé .....qsp 20ml.

-Dilution à 1/10 ème par du phénol saturé (90%) :

-NaCl 30% .....2ml.  
-Phénol saturé .....18ml.

**-Chloroforme – Alcool iso amylique (24/1 v/v) :**

-Chloroforme .....12ml.  
-Alcool iso amylique .....500µl.

**-Tris 10mM – EDTA 1mM, pH 7,5 :**

|                      |           |
|----------------------|-----------|
| -Tris .....          | 0,024g.   |
| -EDTA .....          | 0,006g.   |
| -Eau distillée ..... | qsp 20ml. |

**-Solution de dépôt : Bleu de Bromophénol 0,5% ; EDTA 10mM ; SDS 3% ; Glycérol 50%, dans l'eau :**

|                            |           |
|----------------------------|-----------|
| -Bleu de Bromophénol ..... | 0,1g.     |
| -EDTA .....                | 0,06g.    |
| -SDS .....                 | 0,6g.     |
| -Glycérol 100% .....       | 10ml.     |
| -Eau distillée .....       | qsp 20ml. |

**-Gel d'agarose 0,6% :**

|                      |           |
|----------------------|-----------|
| -Agarose .....       | 0,12g.    |
| -Eau distillée ..... | qsp 20ml. |

**-Solution de visualisation :**

|                                 |            |
|---------------------------------|------------|
| -Bromure d'éthidium (BET) ..... | 0,2mg.     |
| -Eau distillée .....            | qsp 100ml. |

**-Tampon d'électrode : Tris acétate à 40 mM de Tris ; 20mM d'acétate de Na et 2,0mM d'EDTA, pH8,1 :**

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| -Acétate de sodium..... | 1,36g. |
| -Tris-base.....         | 2,4g.  |
| -EDTA.....              | 0,29g. |
| -Eau distillé qsp.....  | 500ml. |

**Annexe 4: Composition des milieux de culture utilisés:**

**Bouillon cœur-cervele (BHIB) : (GUIRAUD, 2003)**

**Composition en g/l**

|                                    |                 |
|------------------------------------|-----------------|
| Protéose-peptone .....             | 10              |
| Infusion de cervelle de veau ..... | 12.5            |
| Infusion de cœur de bœuf.....      | 5               |
| Chlorure de sodium.....            | 5               |
| Phosphate disodique.....           | 2.5             |
| Glucose .....                      | 2               |
| Eau distillée qsp .....            | 1000 mlpH : 7.4 |

Stérilisation : 15 minutes à 120° C

**Bouillon Elliker : (LEVEAU *et al*, 1991)**

**Composition en g /l**

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| Tryptone .....          | 20      |
| Extrait de levure.....  | 5       |
| Gélatine.....           | 2.5     |
| Lactose.....            | 5       |
| Saccharose.....         | 5       |
| Glucose.....            | 5       |
| Acétate de sodium ..... | 1.5     |
| Chlorure de sodium..... | 4       |
| Acide ascorbique .....  | 0.5     |
| Eau distillée qsp.....  | 1000 ml |

pH final : 6.8

Stérilisation: 15 minutes à 120° C

**Bouillon MRS (DE MAN, ROGOZA, SHARPE, 1960) : (LEVEAU *et al*, 1991)**

(HIMEDI Laboratoires, Mumbai, INDIA).

**Composition en g /l**

|  |         |
|--|---------|
| Peptone.....                                   | 10      |
| Extrait de viande.....                         | 8       |
| Extrait de levure.....                         | 4       |
| Acétate de sodium.....                         | 5       |
| Phosphate bi potassique.....                   | 2       |
| Citrate d'ammonium .....                       | 2       |
| Sulfate de magnésium, 7 H <sub>2</sub> O ..... | 0.2     |
| Sulfate de manganèse, 4 H <sub>2</sub> O ..... | 0.05    |
| Glucose .....                                  | 20      |
| Tween 80.....                                  | 1 ml    |
| Agar .....                                     | 15      |
| Eau distillée qsp.....                         | 1000 ml |

pH : 4,3 ± 0,2.

Stérilisation : 15 minutes à 120° C

**Bouillon Nutritif enrichi : (GUIRAUD, 2003)**

**Composition en g/l**

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| Peptone.....            | 10     |
| Extrait de viande.....  | 05     |
| Glucose.....            | 10     |
| Chlorure de Sodium..... | 05     |
| Eau distillée.....      | qsp 1L |

pH 7,2.

Stérilisation : 15 minutes à 120°C.

**Gélose Elliker: (LEVEAU *et al*, 1991)**

**Composition en g /l**

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| Tryptone .....          | 20      |
| Extrait de levure.....  | 5       |
| Gélatine.....           | 2.5     |
| Lactose.....            | 5       |
| Saccharose.....         | 5       |
| Glucose.....            | 5       |
| Acétate de sodium ..... | 1.5     |
| Chlorure de sodium..... | 4       |
| Acide ascorbique .....  | 0.5     |
| Agarose.....            | 9       |
| Eau distillée qsp.....  | 1000 ml |

pH final : 6.8

Stérilisation: 15 minutes à 120° C.

**Gélose Nutritive enrichie à 0,9 % d'agar : (GUIRAUD, 2003)**

**Composition en g/l**

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| Peptone.....            | 10     |
| Extrait de viande.....  | 05     |
| Glucose.....            | 10     |
| Chlorure de Sodium..... | 05     |
| Agar.....               | 09     |
| Eau distillée.....      | qsp 1L |

pH 7,2.

Stérilisation : 15 minutes à 120°C.

**Gélose Nutritive enrichie à 1,5 % d'agar : (GUIRAUD, 2003).**

**Composition en g/l**

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| Peptone.....            | 10     |
| Extrait de viande.....  | 05     |
| Glucose.....            | 10     |
| Chlorure de Sodium..... | 05     |
| Agar.....               | 15     |
| Eau distillée.....      | qsp 1L |

pH 7,2.

Stérilisation : 15 minutes à 120°C.

**Annexe 5: Préparation du gel tricine SDS-PAGE :**

|                      | Separating | Spacer  | Stacking |
|----------------------|------------|---------|----------|
| Protogel Acryl (30%) | 2,75 ml    | 0,67 ml | 0,80 ml  |
| Eau Q                |            | 0,66 ml | 2,17 ml  |
| Gel buffer 3X        | 1,67 ml    | 0,67 ml | 0,99 ml  |
| Glycérol 80%         | 0,83 ml    |         |          |
| TEMED                | 2,5 µl     | 1,0 µl  | 3,0 µl   |
| APS                  | 25 µl      | 10 µl   | 32 µl    |

**Remarque :** Gel buffer (3X) : Tris-base 3M, Ph 8.45, SDS 0.3%

- Après vérification de la propreté de la plaque de verre et du joint, montage de l'appareil et fixation de l'ensemble grâce aux pinces.
- Tracer deux lignes à partir du haut de la petite plaque (environ 1.5 cm et 2.5 cm).
- Couler le gel Separating et Spacer consécutivement jusqu'au trait le plus bas puis le plus haut puis addition d'EtOH 50%.
- Après polymérisation (>30 min) lavage et séchage de la limite supérieure du gel Separating.
- Couler le gel stacking et placer et placer délicatement le peigne (attention aux bulles).
- Laisser >15 min pour une polymérisation totale.

### **Préparation des échantillons :**

20  $\mu$ l d'échantillon + 20  $\mu$ l de tampon de charge non réducteur (Loading buffer non réducteur)

- Migration pendant 15 min à 10 mA par gel
- Migration pendant 80 min à 20 mA par gel

### **Tampon de charge non réducteur (2X):**

- 5 ml Tris-HCl 0.5M, pH 6.8
- 4 ml SDS 20%
- 4 ml Glycérol
- 5 ml Bleu de bromophénol (0.04%)
- 2 ml d'H<sub>2</sub>O.

**Annexe 6 : Répartition des échantillons sur le gel d'électrophorèse des bactériocines :**

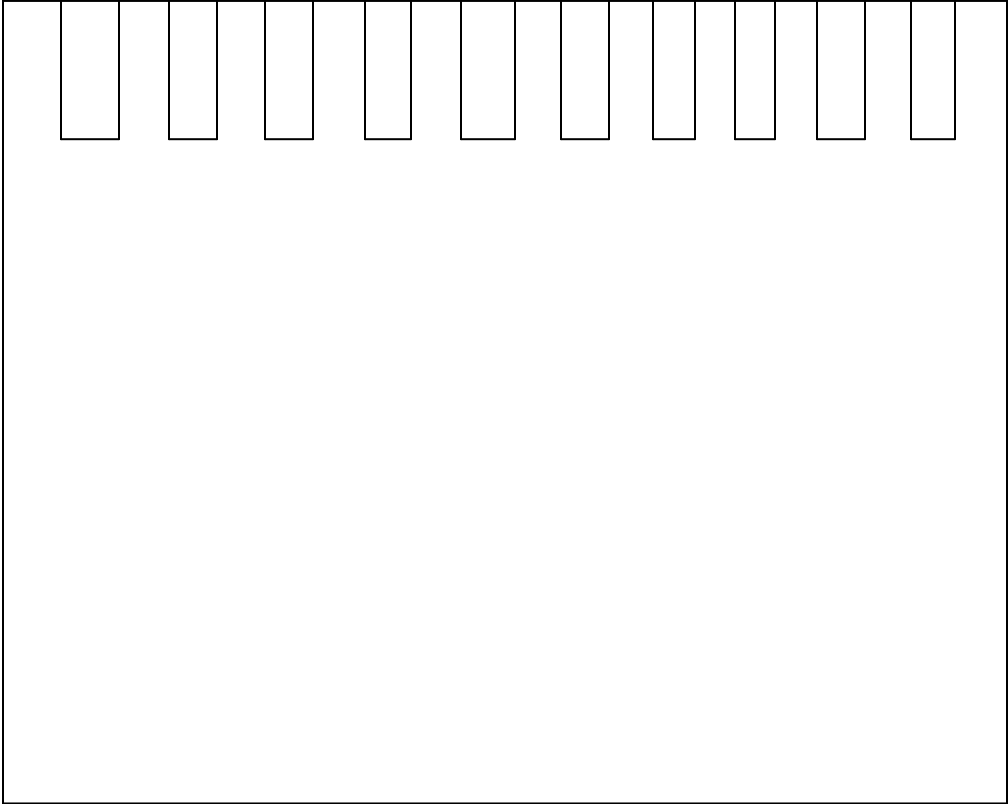
MT      CH7      CH7 Curée      CH5      CH5 Curée      CH7      CH7 Curée      CH5      CH5 Curée

+

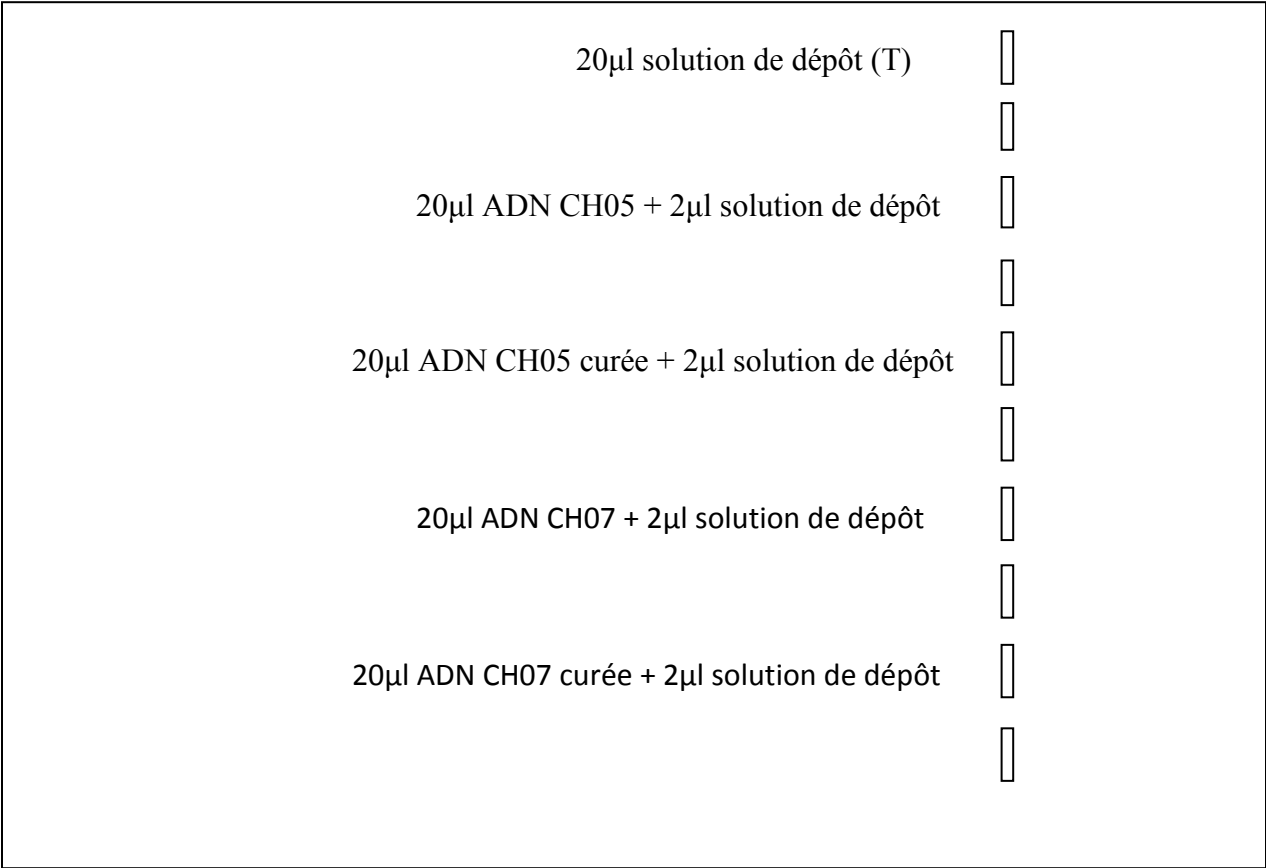


-

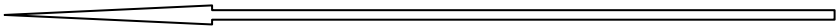
Sens de la migration



**Annexe 7 : Répartition des échantillons sur le gel d'agarose pour l'électrophorèse de l'ADN bactérien :**



+



-

Sens de la migration

**Annexe 8 :** Composition du gel 20% utilisé en PAGE-SDS pour la séparation des bactériocines, des autres protéines bactériennes :

|                      | Separating  | Spacer      | Staking     |
|----------------------|-------------|-------------|-------------|
| Protogel Acryl (30%) | 3,66 ml     | 0,67 ml     | 0,80 ml     |
| Eau Q                |             | 0,66 ml     | 2,17 ml     |
| Gel buffer 3X        | 2,23 ml     | 0,67 ml     | 0,99 ml     |
| Glycérol 80%         | 1,11 ml     |             |             |
| TEMED                | 3,4 $\mu$ l | 1,0 $\mu$ l | 3,0 $\mu$ l |
| APS                  | 34 $\mu$ l  | 10 $\mu$ l  | 32 $\mu$ l  |

**Annexe 9:** Tableau d'identification des acides aminés et leur représentation abrégée.

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