



THÈSE en cotutelle

*présentée pour obtenir le grade
de Docteur en Chimie de*

l'Université de Strasbourg

Faculté de pharmacie
Ecole Doctorale des Sciences Chimiques UMR 7178
Spécialité Chimie Analytique

Et de Docteur en Biologie de

l'Université Sidi Mohamed Ben Abdallah

Faculté des Sciences Dhar ElMahraz -Fès
Centre d'études doctorales "Sciences et Technologies"
Spécialité Microbiologie - biologie moléculaire

Par

Ikram HAMMI

Soutenue le : **16 septembre 2016**

Isolement et caractérisation de bactériocines produites par des souches de bactéries lactiques isolées à partir de produits fermentés marocains et de différentes variétés de fromages français

THÈSE dirigée par :

Saïd ENNAHAR
Rajae BELKHOUCHE

Maître de Conférences, HDR, Université de Strasbourg
Professeur, Université Sidi Mohamed Ben Abdallah, Fès

RAPPORTEURS :

Catherine PERRIN
Hassan HAJJAJ
Mohammed EL HASSOUNI

Professeur, Université de Montpellier 1
Professeur, Université Moulay Ismail, Meknès
Professeur, Université Sidi Mohamed Ben Abdallah, Fès

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Philippe ANDRE
Abdelkarim F.MALTOUF

Professeur, Université de Strasbourg
Professeur, Université Mohammed V, Rabat



Avant-propos

Cette thèse a été réalisée en cotutelle entre l'Université Sidi Mohamed Ben Abdallah, Fès (*Centre d'études doctorales : Sciences et Technologies- Laboratoire Agroalimentaire et Sécurité Sanitaire des Aliments-LASSA*) et l'Université de Strasbourg (*Ecole Doctorale des Sciences Chimiques–D 222 - Equipe de Chimie Analytique des Molécules Bio-Actives-CAMBA*), avec le soutien financier du *programme* de coopération bilatérale franco-marocain *Toubkal* : PHC-Volubilis : N° MA/14/309 - Campus France N° 30366TM.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse a donné lieu aux publications et communications suivantes:

Publication:

- Hammi Ikram; Delalande François; Belkhou Rajae; Marchioni Eric; Cianferani Sarah et Ennahar Saïd. (2016). Maltarin CPN, a new class IIa bacteriocin produced by *Carnobacterium maltaromaticum* CPN isolated from mold ripened cheese. *Journal of Applied Microbiology*.
- Ikram Hammi; Saïd Ennahar; François Delalande; Eric Marchioni; Sarah Cianferani; Rajae Belkhou. Native production of pediocin PA-1 by *Enterococcus faecium* E16 isolated from goat cheese. Article soumis. *Journal of Dairy Research*.

Communications :

Communications orales :

- Hammi I, S. Ennahar et R. Belkhou. Purification et caractérisation de nouvelles bactériocines produites par des bactéries lactiques pour une utilisation en agro-industrie. *Congrès magrébins sur les toxi-infections alimentaire. Fès, 16-18, avril, 2014*.
- Hammi I, R. Belkhou et S. Ennahar. Purification et caractérisation de bactériocines produites par des bactéries lactiques isolées à partir d'aliments fermentés traditionnels

marocains. *Journée des doctorales de l'Ecole doctorale des sciences chimiques. Strasbourg, 7, novembre, 2014.*

- Hammi I, R. Belkhou, E. Marchioni et S. Ennahar. Purification de bactériocines produites par des bactéries lactiques isolées à partir des produits laitiers fermentés marocains. *Séminaire de Microbiologie de Strasbourg, Collège Doctoral Européen. Strasbourg, 9 avril, 2015.*
- Hammi I, S. Ennahar et R. Belkhou. Purification et caractérisation de bactériocines produites par des bactéries lactiques isolées à partir des aliments fermentés pour des applications en agro-industrie. *Séminaire "Première journée scientifique du doctorant en biologie de l'Université Sidi Mohamed Ben Abdallah". FST-Fès, 13 octobre, 2015.*
- Hammi I, S. Ennahar et R. Belkhou. Purification et identification structurale des bactériocines produites par des bactéries lactiques. *2ème Congrès International de l'AJC sous le thème : "Substances Naturelles Et Développement Durable" . FS-Rabat, 19-21 mai 2016.*

Communications par affiche :

- El Amraoui A, I. Hammi, N. El Bekkali, A. Hammoumi et R. Belkhou. Etude de la stabilité technologique de bactéries lactiques utilisées pour la préparation de Lben.. Poster presentation. *The second edition of the international congress: "Microbial Biotechnology for Development" (MICROBIOD 2). FS- Marrakesh 2- 4th October 2012.*
- Hammi I, A. Elamraoui, S. Ennahar et R. Belkhou. Purification of bacteriocin produced by a strain of enterococcus isolated from cheese. *The III International Conference on Antimicrobial Research, ICAR. Madrid, 1-3, octobre, 2014.*
- Hammi I, R. Belkhou, E. Marchioni et S. Ennahar. Purification et identification structurale de 3 bactériocines produites par *Enterococcus faecalis* CAN1. *Congrès international "Biotechnologie au service de la société, BIOSES". FST-Fès, 22-24 octobre, 2015.*
- Hammi I, S. Ennahar et R. Belkhou. Purification et caractérisation structurale de bactériocines pour des applications en agroalimentaire. *Séminaire "Pôle de biotechnologie". FS-Fès, 13 novembre, 2015.*

Remerciements

Mes remerciements à toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail. Le résultat d'un tel projet résulte en effet d'un travail d'équipe et non d'une seule personne.

En premier lieu, je voudrais remercier Mme Amina BOUSETA et Mr. Eric MARCHIONI pour m'avoir si chaleureusement accueilli dans leurs équipes, pour leurs conseils judicieux, pour leurs encouragements et pour leurs nombreuses qualités humaines.

Je remercie également Monsieur BEN BASSOU, Directeur de l'Ecole Supérieure de Technologie pour son accueil.

Je ne sais comment remercier mes directeurs de thèse, Mme. Rajae BELKHOUCHE et Mr. Saïd ENNAHAR pour la confiance qu'ils m'ont accordée en encadrant ce travail, pour m'avoir guidé et soutenu. Merci pour votre patience, votre générosité de me transmettre vos connaissances scientifiques, votre savoir-faire et vos recettes et astuces. Merci pour toutes les discussions et les conseils très enrichissants, pour tout l'intérêt manifesté à l'égard de ce travail et pour toutes les heures consacrées à corriger ce document malgré tous vos empêchements. Un merci spécial pour vos secours pendant certains de mes périodes difficiles, et pour vos qualités humaines. Si j'en suis là aujourd'hui, c'est grâce en grande partie à vous. Que vous trouvez ici l'expression de ma reconnaissance et de ma profonde gratitude.

J'adresse toute ma reconnaissance au Pr. Abdelkarim FILALI-MALTOUF, de la Faculté des Sciences, Université Mohammed V de Rabat d'avoir accepté de présider le jury de soutenance.

Tous mes remerciements aux Pr. Catherine PERRIN de la Faculté de Pharmacie, Université de Montpellier 1, Pr. Mohammed EL HASSOUNI de la Faculté de sciences Dhar El Mahraz, Université Sidi Mohammed Ben Abdallah Fès et Pr. Hassan HAJJAJ de la Faculté des Sciences, Université Moulay Ismail, Meknès-Maroc d'avoir accepté de participer au jury de ce travail.

Je remercie également Pr. Philippe ANDRE de la Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg d'avoir accepté participer à ce jury de thèse et d'évaluer ce travail.

Je tiens à remercier vivement tous les membres du Laboratoire LASSA, Rabia BOUSLAMTI, Sanae LAIRINI et Ahde EL IMACHE pour leurs encouragements. Un merci chaleureux spécialement à Aayah HAMOUMI pour son aide, sa gentillesse, sa disponibilité d'avoir toujours prêle à répondre à mes questions, son esprit critique, son soutien moral, et surtout sa bonté de cœur. Un grand merci à Ahmed TICHOUT, préparateur de laboratoire pour son aide technique en continu.

Un grand merci à tous les membres de l'équipe CAMBA, Françoise, Sonia, Diane, Christophe, Manale, Minjie et Myriam, et particulièrement à Michel de m'avoir aidé à s'intégrer dans l'équipe, de m'initier aux règles et aux conditions de travail, à Céline d'être toujours prêle à m'aider et à Martine pour son sourire interminable, encourageant.

Un gros merci à tous mes amis et collègues, docteurs et futurs docteurs que j'ai rencontré durant ces quatre ans de thèse, pour avoir entretenu une ambiance agréable pour le travail et pour leurs amitiés: Amina, Leila, Safae, Fatima, Mounia, Boujamaa, Flavio, Kamar, Yousra, Yasmin, Mamado, Ghita, Abdelali, Justine, Lan et Mohamed.

Merci à toutes les personnes qui ont fait de mon séjour à Strasbourg une expérience inoubliable. Merci à la famille ENNAHAR pour son hospitalité. Merci à Malak pour son aide pendant les premiers jours difficiles à Strasbourg. Ghina, Naima, Nassima, Mohamed, Rana, Ali, Yousra, Houda, Liliana, Hanadi et Dounia, Merci de votre amitié.

Un grand merci à tous les collaborateurs pour la disponibilité des infrastructures qui assure le bon déroulement de ce travail de thèse.

Mes remerciements seront incomplets, si je n'adresse pas mes chaleureux remerciements à mes parents et mes chères sœurs qui m'ont soutenu toutes ces années. Qu'ils trouvent ici ma reconnaissance, ainsi que ma gratitude pour le soutien financier et moral qu'ils ont pu apporter pour aboutir à ce rêve et faire de moi ce que je suis.

Liste des abréviations

A	: Absorbance
Ab	: Absence de croissance
ACN	: Acétonitrile
AOP	: Appellation d'Origine Protégée
ATCC	: American Type Culture Collection
ATP	: Adénosine TriPhosphate
CECT	: Collection Espagnol de Culture Type
CIP	: Collection de l'Institut Pasteur
DSM	: Collection allemande de microorganismes
ESI-TOF	: ElectroSpray Ionization – tof time of flight
FAO	: Food and Agriculture Organization
GRAS	: Generally Recognized As Safe
HPLC	: Chromatographie en phase liquide à haute performance
LC	: Collection du Laboratoire
LC-MS/MS	: Liquid Chromatography coupled to tandem spectrometry
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
ND	: Non déterminé
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
PCR	: Réaction en Chaîne par Polymérase
PITC	: Phénylisothiocyanate
TFA	: Acide TriFluoroacétique
Tr	: Trouble de croissance
TIAC	: Toxi Infections Alimentaires Collectives
UA	: Unité Arbitraire

Liste des figures

Figure 1. Arbre phylogénique des bactéries lactiques avec les genres <i>Aerococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Listeria</i> et <i>Staphylococcus</i> (Axelsson, 2004)	8
Figure 2. Principales voies cataboliques du glucose chez les bactéries lactiques (Dellaglio et al., 1994).	10
Figure 3. Formation des résidus Lanthionine (Lan) ou de Methyllanthionine (MeLan) dans le prépeptide lantibiotique (Willey & Van Der Donk, 2007).....	19
Figure 4. Structures représentatives des sous-classes des lantibiotiques (Lili & Van Der Donk, 2004)	20
Figure 5. Alignement de séquences des bactériocines de la sous-classe IIa (Cui et al., 2012).....	23
Figure 6. Modèle représentant les structures des des deux peptides constituant la lactococcine G ainsi que leur orientation dans la membrane des bactéries cibles (Oppegård et al., 2010).....	26
Figure 7. Modèle représentant les structures tridimensionnelles de la lactococcine G et des plantaricines EF et JK en contact avec des micelles	26
Figure 8. Régulation de la production, modification post-traductionnelles et auto-immunité de la nisine (Patton & Van Der Donk, 2005).....	29
Figure 9. Organisation des clusters des gènes impliqués dans la biosynthèse de certains lantibiotiques.	31
Figure 10. Aperçu schématique du mécanisme proposé pour la production de bactériocines de la classe IIa (Ennahar et al., 2000).....	31
Figure 11. Mécanisme de transport et de maturation des pré-bactériocines de la sous-classe IIa possédant un peptide leader (Simon, 2001)	32
Figure 12. Schéma des étapes utilisées pour la purification des bactériocines.....	50
Figure 13. Exemple des zones d'inhibitions obtenues par le test direct.....	61
Figure 14. Exemple des zones d'inibitions obtenues par la méthode des spots.	61
Figure 15. Profil chromatographique à 280 nm après séparation sur colonne C18 analytique de la fraction III de <i>C. maltaromaticum</i> CPN1 avec un gradient linéaire de 20 à 50% d'acétonitrile en 30 min, de 50 à 100% en 10 min et 100% en 5 min	63
Figure 16. Spectre de masse réalisé par l'ESI-Q-TOF du peptide CPN1 produit par <i>C. maltaromaticum</i> CPN1. 63	
Figure 17. Profil chromatographique à 280 nm. a) après séparation sur colonne C8 semi-préparative de la fraction II d' <i>E. faecium</i> E16 avec un gradient linéaire de 0 à 90% d'acétonitrile à 0,1% de TFA dans de l'eau à 0,1% de TFA en 54 min. b) après séparation sur colonne C18 analytique de la fraction III d' <i>E. faecium</i> E16 avec un gradient linéaire de 20 à 50% d'acétonitrile en 30 min, de 50 à 100% en 10 min et 100% en 5 min.	65
Figure 18. Spectres de masses réalisés par ESI-Q-TOF de la pédiocine PA-1 purifiée à partir de: a) <i>E. durans</i> A4; b) <i>E. durans</i> T4 ; c) <i>E. faecium</i> E16 ; d) par <i>E. faecalis</i> SAL1.....	66

Figure 19. Profil chromatographique à 280 nm après séparation sur colonne C8 semi-préparative de la fraction II d' <i>E. faecalis</i> CAN1 avec un gradient linéaire de 0 à 90% d'acétonitrile à 0,1% de TFA dans de l'eau à 0,1% de TFA en 54 min.	68
Figure 20. Profil chromatographique à 280 nm après séparation sur colonne C18 analytique de la bactériocine CAN1E avec un gradient linéaire de de 20 à 50% d'acétonitrile à 0,1% de TFA en 30 min, de 50 à 100% en 10 min et 100% en 5 min.	69
Figure 21. Profil chromatographique à 280 nm après séparation sur colonne C8 semi-préparative de la fraction II d' <i>E. faecalis</i> CAN1 avec un gradient linéaire de 0 à 90% d'acétonitrile à 0,1% de TFA dans de l'eau à 0,1% de TFA en 54 min.	70
Figure 22. Profil chromatographique à 280 nm après séparation sur colonne C18 analytique des bactériocines, a)CAN1B, b) CAN1D, avec un gradient linéaire de de 20 à 50% d'acétonitrile à 0,1% de TFA en 30 min, de 50 à 100% en 10 min et 100% en 5 min.....	71
Figure 23. Spectres de masses réalisés par ESI-Q-TOF des bactériocines produite par <i>E. faecalis</i> CAN1.a) bactériocine CAN1B ;b) bactériocine CAN1D ;c) bactériocine CAN1E.	72
Figure 24. Spectres de masses réalisés par l'ESI-Q-TOF des bactériocines produites par <i>E. faecium</i> E14.a) bactériocine E14A; b) bactériocine E14D.....	74
Figure 25. Profil chromatographique à 280 nm après séparation sur colonne C18 analytique de la fraction III de <i>L. plantarum</i> C avec un gradient linéaire de de 20 à 50% d'acétonitrile à 0,1% de TFA en 30 min, de 50 à 100% en 10 min et 100% en 5 min.....	76
Figure 26. Spectres de masses réalisés par l'ESI-Q-TOF des peptides B, C et LS3 produits par :a) <i>L. plantarum</i> B; b) <i>L. plantarum</i> C; c) produit <i>L. plantarum</i> LS3.....	77
Figure 27. Spectres de masses réalisés par l'ESI-Q-TOF des bactériocines produits par <i>L. plantarum</i> MJP1.a) MJP1A ; b) MJP1B.	78
Figure 28. Spectres de masses réalisés par l'ESI-Q-TOF des bactériocines produites par <i>L. paracasei</i> GRU3.a) GRU3A; b) GRU3B ; c) GRU3D.	80
Figure 29. Profil chromatographique à 280 nm après séparation sur colonne C18 analytique de la fraction III de <i>P. acidilactici</i> CAN2 avec un gradient linéaire de de 20 à 50% d'acétonitrile à 0,1% de TFA en 30 min, de 50 à 100% en 10 min et 100% en 5 min.	82
Figure 30. Comparaison des spectres de masses de la pédiocine PA-1: P1 produite par <i>P. acidilactici</i> P1 (cette étude) et L3 produite par <i>L. plantarum</i> WHE 92, (Ennahar, et al., 1996).a) spectres obtenus ; b) après le zoom sur 5+.	83
Figure 31. Comparaison des spectres de masses de la recherche d'ion parent de la pédiocine PA-1 produite par.a) <i>L. plantarum</i> WHE 92 (Ennahar et al., 1996); b) <i>P. acidilactici</i> P1(cette étude).	84
Figure 32. Croissance de la bactérie <i>E. hirae</i> CIP 5855 en présence de différentes concentrations de la pédiocine PA-1 dans le milieu MRS pendant 48h à 34°C.	91
Figure 33. Croissance de la bactérie <i>E. faecalis</i> LC E4 en présence de différentes concentrations de la pédiocine PA-1 dans le milieu MRS pendant 48h à 34°C.	91
Figure 34. Croissance de la bactérie <i>L. plantarum</i> LC 804 en présence de différentes concentrations de la pédiocine PA-1 dans le milieu MRS pendant 48h à 34°C.....	92

Figure 35. Croissance de la bactérie <i>E. faecium</i> JA en présence de différentes concentrations de la pédiocine PA-1 dans le milieu MRS pendant 48h à 34°C.	92
Figure 36. Suivi de la viabilité cellulaire, exprimée par le rapport de la fluorescence verte/rouge, lors de l'exposition à l'entéroisine AS-48.	95
Figure 37. Suivi de la viabilité cellulaire, exprimée par le rapport de la fluorescence verte/rouge, lors de l'exposition à la pédiocine PA-1.	95
Figure 38. Suivi de la viabilité cellulaire, exprimée par le rapport de la fluorescence verte/rouge, lors de l'exposition à l'entéroisine 1071.	96
Figure 39. Suivi de la viabilité cellulaire, exprimée par le rapport de la fluorescence verte/rouge, lors de l'exposition à la plantaricine 423.	96
Figure 40. Suivi de la viabilité cellulaire, exprimée par le rapport de la fluorescence verte/rouge, lors de l'exposition à la BacSJ2-8.	97
Figure 41. Oxydation des résidus méthionine dans une structure protéique.	105

Liste des tableaux

Tableau 1. Bactériocines placées dans plus d'une sous-classe selon la classification (Abdelmajid <i>et al.</i> , 2010).	17
Tableau 2. Séquences en acides aminés des bactériocines de la classe IIa	24
Tableau 3. Séquences en acides aminés de bactériocines à deux peptides de classe IIb	27
Tableau 4. Exemples de bactériocines de la sous-classe II d "leaderless bacteriocins"	28
Tableau 5. Alignement des séquences des peptides leaders des bactériocines de la sous-classe IIa sur la base du motif double glycine C-terminal (Ennahar <i>et al.</i> , 2000).	32
Tableau 6. Espèces cibles utilisées pour la mise en évidence et l'établissement du spectre d'activité antimicrobienne.....	44
Tableau 7. Amorces utilisées pour l'amplification des gènes codant pour les entérocinés A, B, P, entérocin AS-48, entérocinés L50A, L50B et entérocinés 1071A et 1071B.....	51
Tableau 8. Exemple d'un plan de plaque de 96 puits pour la détermination du spectre d'activité d'une bactériocine sur plusieurs souches cibles	54
Tableau 9. Différentes longueurs d'ondes d'excitation et d'émission testées pour le SYTO 9 et l'Iodure de Propidium.....	55
Tableau 10. Combinaisons à différents pourcentage du SYTO 9 et de l'Iodure de propidium testées.	55
Tableau 11. Origines des échantillons analysés.	58
Tableau 12. Spectres d'activité des extraits de culture des différents isolats producteurs sélectionnés. L'activité a été quantifiée par mesure des diamètres des zones d'inhibition obtenues par la méthode des spots.....	60
Tableau 13. Identification des souches dotées d'activité antimicrobienne.....	62
Tableau 14. Séquence peptidique de la maltaricine CPN obtenue par dégradation d'Edman.....	64
Tableau 15. Masses moléculaires de la pédiocine PA-1 correspondant aux des peptides purifiés A4, T4, E16 et SAL1, mesurées par le spectromètre de masse ESI-Q-TOF.	66
Tableau 16. Séquence d'acides aminés de la pédiocine PA-1 (peptides A4, T4, E16 et SAL1) analysée par nano LC-MS/MS suite à une digestion trypsique, et identifiée par recherche Mascot sur la base de données NCBIInr. 67	67
Tableau 17. Masses moléculaires de l'entérocinés 1071A (peptide CAN1D), de l'entérocinés 1071B (peptide CAN1B) et de l'entérocin AS-48 (peptide CAN1E) mesurées par ESI-Q-TOF.	73
Tableau 18. Séquence d'acide aminé de l'entérocin 1071A issue après dégradation d'Edman et de l'entérocin 1071B et l'entérocin AS-48 déduit de la bibliographie.	73
Tableau 19. Séquence d'acides aminés de la pédiocine PA-1 (peptide E14A) issue de la digestion trypsique, analysée par nano LC-MS/MS et identifiée par recherche Mascot sur la base de données NCBIInr.....	75
Tableau 20. Masses moléculaires de la pédiocine PA-1 (peptides B, C et LS3) mesurées par le spectromètre de masse ESI-Q-TOF.....	76

Tableau 21. Séquences d'acides aminés de la pédiocines PA-1 (peptides B, C et LS3), issues de la digestion trypsique, analysés par nano LC-MS/MS et identifiée par recherche Mascot sur la base de données NCBIInr. ...	77
Tableau 22. Séquence d'acides aminés de la plantaricine 423 (peptide MJ1A) issue de la digestion trypsique, analysée par nano LC-MS/MS et identifiée par recherche Mascot sur la base de données NCBIInr et de la dégradation d'Edman. En rouge les différences avec la séquence de la plantaricine 423 répertorié dans la littérature.	79
Tableau 23. Masses moléculaires des peptides GRU3A, GRU3B, GRU3C et GRU3D mesurées par le spectromètre de masse ESI-Q-TOF.....	80
Tableau 24. Séquences d'acides aminés de la pédiocine PA-1 (peptide GRU3A) et de la bactériocine BacSJ2-8 (peptide GRU3D) issues de la digestion trypsique, analysées par nano LC-MS/MS et identifiées recherche Mascot sur la base de données.	81
Tableau 25. Souches indicatrices choisis pour tester l'activité antimicrobienne par la technique des spots pour les souches <i>Pediococcus acidilactici</i> CAN2, P1, BAA2, OIF3 et SNF1.....	81
Tableau 26. Masses moléculaires et identification des peptides BAA2, OIF3, SNF1, CAN2 et P1 mesurées par le spectromètre de masse ESI-Q-TOF.....	82
Tableau 27. Séquences en acides aminées de la pédiocine PA-1 (peptide BAA2, OIF3, SNF1, CAN2 et P1) issues de la digestion trypsique, analysées par nano LC-MS/MS et identifiées recherche Mascot sur la base de données.	84
Tableau 28. Suivi de l'activité antimicrobienne des bactériocines étudiées au cours des étapes de purification.	86
Tableau 29. Spectres d'activité des différentes bactériocines purifiées. L'activité a été quantifiée par mesure du diamètre des zones d'inhibition obtenues par la méthode des spots (MRS / 18h à 24h / 34°C). Toutes les souches indicatrices ont été cultivées dans un bouillon MRS.....	88
Tableau 30. Comparaison de l'activité antimicrobienne (en UA/ml) de l'entérocoque 1071 et des deux peptides antimicrobiens qui la constituent (entérocoque 1071A et entérocoque 1071B) à des quantités égales de 10µl : 10µl.	90
Tableau 31. La valeur du « Retard de croissance » calculée pour chaque bactérie indicatrice en fonction de différentes concentrations de pédiocine PA-1.....	93
Tableau 32. Souches indicatrices retenues pour chacune des bactériocines testées.....	94
Tableau 33. Test de croissance des variants de <i>L. monocytogenes</i> 3b à différentes concentrations des extraits actifs des deux souches <i>L. plantarum</i> B et <i>L. paracasei</i> GRU3.....	98
Tableau 34. Concentration cellulaire en UFC/ml de <i>L. monocytogenes</i> 3b dans l'échantillon témoin, en présence de la souche <i>L. plantarum</i> B, ainsi qu'en présence de la souche <i>L. paracasei</i> GRU3.	99
Tableau 35. Alignement de la séquence d'acides aminés de la maltaricine CPN avec les séquences des bactériocines proches de la sous-classe IIa. Les encadrés indiquent les acides aminés polaires (vert) et apolaires (orange) hautement conservés.....	102
Tableau 36. Masses moléculaires des différentes bactériocines produites par différentes souches de <i>C. maltaromaticum</i>	103
Tableau 37. Souches multi-productrices de bactériocines.	105

Tableau 38. Tableau récapitulatif des différentes souches productrices, des bactériocines purifiées et des séquences peptidiques correspondantes.	115
---	-----

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	1
Synthèse bibliographique	5
I. Bactéries lactiques	6
1. Généralités.....	6
2. Historique et taxonomie	7
3. Propriétés technologiques	8
a. Capacité acidifiante	8
b. Capacité texturante	10
c. Capacité aromatisante	11
d. Effet sur la santé (caractère probiotique)	11
4. Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques	13
a. Acides organiques	13
b. Peroxyde d'hydrogène.....	13
c. Dioxyde de carbone.....	14
d. Diacétyl	14
e. Reutéline	14
f. Bactériocines	14
II. Bactériocines produites par les bactéries lactiques	15
1. Généralités.....	15
2. Classification.....	16
2.1. Classe I : Lantibiotiques	18
2.2. Classe II : les bactériocines thermostables non modifiés	20
a. La sous-classe IIa	21
b. La sous-classe IIb	25
c. La sous-classe IIc	28
d. La sous-classe IId	28
e. La sous-classe IIe	29
3. Biosynthèse des bactériocines et régulation.....	29

4.	Mécanismes d'action.....	33
5.	Auto-immunité	33
6.	Résistance.....	34
7.	Applications et intérêts.....	35
7.1.	Domaines d'applications	35
a.	Applications alimentaires.....	35
b.	Applications médicales	36
7.2.	Etat des lieux des utilisations.....	37
7.3.	Contraintes d'utilisation et de mise sur le marché.....	38
III.	Risques alimentaires liés à <i>Listeria monocytogenes</i>	39
1.	pathogènes alimentaires	39
2.	<i>Listeria monocytogenes</i> et les TIAC	39
3.	Qualité hygiéniques des produits laitiers fermentés traditionnels marocains	40
	Matériel et méthodes	42
I.	Recherche et identification des bactéries productrices des bactériocines.....	43
1.	Isolements et purifications	43
2.	Mise en évidence de l'activité antimicrobienne.....	45
2.1.	Test direct	45
2.2.	Test indirect	46
2.3.	Test de la dilution critique	46
3.	Identifications bactériennes.....	46
3.1.	Par PCR	46
3.2.	Par spectrométrie de masse.....	47
II.	Purification et étude structurale des bactériocines	47
1.	Purification des bactériocines.....	47
1.1.	Préparation de l'extrait de culture	47
1.2.	Concentration par chromatographie flash en phase inverse	47
1.3.	Purification par échange de cations	48
1.4.	Purification par chromatographie en phase inverse (HPLC).....	48
2.	Détermination de la masse moléculaire.....	51
3.	Séquençage des gènes codant pour la production de bactériocines	51

4.	Détermination de la séquence peptidique.....	52
4.1.	Séquençage par dégradation d'Edman	52
4.2.	Analyse par spectrométrie de masse.....	52
III.	Etude de l'activité des bactériocines purifiées	53
1.	Spectres d'activité	53
2.	Mode d'action	54
IV.	Etude de la résistance de <i>L. monocytogenes</i>	56
V.	Application des souches productrices des bactériocines B et GRU3 dans un modèle de Lben	56
	Résultats et discussion	57
	Résultats	58
I.	Recherche de bactéries productrices des bactériocines.....	58
1.	Isolement et purification.....	58
2.	Mise en évidence de l'activité antimicrobienne	59
3.	Identification des isolats actifs	61
II.	Purification et étude structurale des bactériocines	62
1.	Bactériocine du genre <i>Carnobacterium</i>	62
2.	Bactériocines du genre <i>Enterococcus</i>	64
2.1.	<i>E. durans</i> A4 et T4, <i>E. faecium</i> E16 et <i>E. faecalis</i> SAL1	64
2.2.	<i>E. faecalis</i> CAN1	67
2.3.	<i>E. faecium</i> E14.....	73
3.	Bactériocines de genre <i>Lactobacillus</i>	75
3.1.	<i>L. plantarum</i> B, C et LS3	75
3.2.	<i>L. plantarum</i> MJP1	77
3.3.	<i>L. paracasei</i> GRU3.....	79
4.	Bactériocines de genre <i>Pediococcus</i>	81
4.1.	<i>P. acidilactici</i> BAA2, CAN2, OIF3, P1 et SNF1	81
5.	Pureté et activité antimicrobienne des bactériocines au cours de la purification.....	85
III.	Etude de l'activité des bactériocines purifiées	87
1.	Spectre d'activité.....	87

1.1. Sur milieu solide.....	87
1.1. Dans milieu liquide.....	90
2. Mode d'action	94
IV. Etude de la résistance de <i>L. monocytogenes</i>	97
V. Application des souches productrices des bactériocines B et GRU3 dans un modèle de Lben	98
Discussion	100
I. Recherche de bactéries lactiques productrices des bactériocines	100
II. Purification et déterminations structurales des bactériocines	101
III. Etude de l'activité des bactériocines purifiées	107
1. Spectre d'activité.....	107
2. Mode d'action	108
CONCLUSION GENERALE	111
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	117
Résumé.....	133

INTRODUCTION GENERALE

Les bactéries lactiques forment un groupe de bactéries bénéfiques pour l'homme. Elles colonisent différents biotopes microbiens allant du sol et des plantes au système digestif de l'homme. Le point commun qui caractérise ce groupe est la production d'acide lactique comme produit final du processus de fermentation de plusieurs substrats carbonés. De fait, les bactéries lactiques sont utilisées depuis des millénaires dans la production de nombreux aliments. Elles sont surtout connues dans la préparation des laitages fermentés, mais également dans le saumurage des légumes, la boulangerie, la fabrication du vin, etc. De par leurs différentes propriétés technologiques, elles contribuent à la texture, ainsi qu'à la flaveur des aliments, notamment par la production de composés aromatiques. Sur le plan hygiénique, elles freinent le développement de la flore indésirable (Benkerroum et Tamime 2004) et améliorent la conservation de l'aliment, par l'abaissement du pH et la production de plusieurs métabolites ayant un effet antimicrobien (Piard & Desmazeaud, 1991; Dortu & Thonart, 2009; Moraes *et al.*, 2010. Leur introduction dans les aliments soit de manière empirique (Ross *et al.*, 2002) soit de façon industrialisée afin d'améliorer la qualité sanitaire et prolonger la conservation de l'aliment est très répandue.

La bio-conservation ou bien la technologie dite «douce» de conservation des aliments est une conservation naturelle qui préserve les propriétés organoleptiques et nutritionnelles de l'aliment, par l'utilisation de microorganismes vivants (Gálvez *et al.*, 2007; Settanni & Corsetti, 2008). Ceci résulte en une réduction logique du recours aux conservateurs "chimiques", dont certains ont montré des effets indésirables sur la santé de l'Homme, ainsi qu'aux traitements thermiques souvent préjudiciables aux propriétés organoleptiques et nutritionnelles des aliments. La bio-conservation par les bactéries lactiques est due à leurs capacités à produire plusieurs métabolites antimicrobiens, tels que les acides organiques (acide lactique, acide acétique,...), le peroxyde d'hydrogène, l'éthanol, le diacétyle, la reutérine, le dioxyde de carbone et les bactériocines (Klaenhammer 1988; Abee *et al.*, 1995). Ces dernières, font depuis quelques décennies, l'objet d'innombrables études notamment dans l'objectif d'applications alimentaires.

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens synthétisés par voie ribosomique, produits par des bactéries naturellement immunisées à leurs propres bactériocines (Cotter *et al.*, 2005; Cotter *et al.*, 2013). Elles ont un spectre d'activité plus ou moins large (Cotter *et al.*, 2005), qui, souvent, inclut des bactéries pathogènes. Certaines bactériocines ont une activité antimicrobienne qui s'étale jusqu'aux protozoaires, levures, champignons et virus (Reddy *et al.*, 2004). Leur dégradation par les enzymes protéolytiques, en particulier les protéases du

tractus gastro-intestinal des mammifères, ainsi que l'absence de toxicité pour l'Homme, rendent leur consommation sans danger (Zacharof et Lovittb 2012). Le spectre d'activité des bactériocines, leur capacité à inhiber des bactéries pathogènes, leur thermo-stabilité et leur résistance aux variations de pH, sont les principales caractéristiques qui doivent être prises en compte lors de la sélection des souches productrices pour des applications dans l'industrie agroalimentaire (Gálvez *et al.*, 2007).

Du fait que les bactéries lactiques jouissent de statut GRAS (Generally Recognized as Safe) (Vescovo *et al.*, 1996), leur utilisation en tant que ferments et implicitement comme producteurs de bactériocines est très répandue et n'est soumise à aucune réglementation particulière (Montville et Winkowski, 1997). Cependant, l'application directe de bactériocines dans les aliments se heurte à une contrainte réglementaire. Jusqu'à présent, la nisine est la seule bactériocine légalement commercialisée comme conservateur alimentaire (Cotter *et al.*, 2005). Elle a été jugée, par des comités d'experts conjoints de l'OMS et de la FAO en 1969, comme additif alimentaire sans danger pour l'homme (Cotter *et al.*, 2005). En 1983, la nisine a été incluse dans la liste européenne des additifs alimentaires sous le numéro E234 (Milles *et al.*, 2011). En plus des applications alimentaires, les bactériocines ont un immense potentiel dans le domaine médical. Elles peuvent être utilisées contre différentes infections causées par des bactéries pathogènes et même contre certains antibio-résistants notoires.

Dans ces conditions, il apparaît intéressant et utile de collecter et de sélectionner de nouvelles souches de bactéries, issues de différents biotopes naturels, afin d'en exploiter les propriétés technologiques et particulièrement leur capacité à produire des bactériocines. Ceci permet éventuellement de découvrir des producteurs plus performants (nombre de bactériocines et quantités produites), de découvrir de nouvelles structures peptidiques et de contribuer ainsi à une meilleure connaissance des caractéristiques de ces métabolites. Par ailleurs, le fait de disposer d'une plus large gamme de bactériocines et de bactéries productrices de différentes sources permet de répondre aux besoins, sans cesse croissant des professionnels de l'agro-alimentaire, de moyens alternatifs de conservation des aliments.

Dans ce contexte, ce travail de thèse avait pour objectifs :

- le criblage de nouvelles souches de bactéries lactiques productrices de substances antimicrobiennes de type bactériocines, à partir de différents produits fermentés traditionnels marocains et de différents fromages français ;
- la purification, l'isolement et l'étude structurale des bactériocines produites ;

- l'étude de l'activité des bactériocines pures retenues, en ciblant une large gamme de bactéries lactiques ainsi que des pathogènes ;
- l'application, à l'échelle du laboratoire, de souches productrices de bactériocines dans un modèle d'aliment fermenté contaminé par *Listeria monocytogenes*.

CHAPITRE 1

Synthèse bibliographique

I. Bactéries lactiques

Les bactéries lactiques appartiennent à un groupe de bactéries bénéfiques, qui se trouvent partout dans la nature ainsi que dans le système digestif de l'homme. Depuis des millénaires, elles sont utilisées dans l'alimentation humaine. Actuellement, dans l'industrie agroalimentaire, les bactéries lactiques occupent une place importante parmi les auxiliaires de fabrication. Si elles sont surtout connues pour le rôle qu'elles jouent dans le secteur laitier (Dortu & Thonart, 2009; Moraes *et al.*, 2010), elles sont utilisées également dans le saumurage des légumes, les salaisons des viandes *et* des poissons, ainsi qu'en boulangerie et dans la fabrication du vin. Elles disposent généralement du statut GRAS (Vescovo *et al.*, 1996).

1. Généralités

Les bactéries lactiques sont des microorganismes unicellulaires procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Elles sont à Gram positif, peuvent avoir des formes coccoïdes, coccobacillaires, ou bacillaires (Klein *et al.*, 1998; Badis, *et al.*, 2005), sont non pigmentées, immobiles et non sporulantes. Les bactéries lactiques tolèrent des pH acides, ne possèdent pas de catalase et possèdent un métabolisme anaérobie strict ou aérotoleérant (Hardie & Whiley, 1997). De trop grandes teneurs en oxygène peuvent leur être néfastes en raison de l'absence de chaîne respiratoire. La plupart des bactéries lactiques sont équipées génétiquement pour avoir un métabolisme respiratoire, mais elles sont incapables de respirer si l'hème, n'est pas présent dans le milieu (Lechardeur *et al.*, 2011). L'hème est un cofacteur indispensable au cytochrome c-oxydase le dernier accepteur d'électrons de la chaîne respiratoire.

Les bactéries lactiques produisent de l'acide lactique (Kandler & Weiss, 1986) comme produit principal du métabolisme en fermentant les sucres (glucose, fructose, mannose, galactose, saccharose et lactose) chez les bactéries homofermentaires, en plus de l'éthanol et CO₂ chez les bactéries hétérofermentaires. Leur ADN présente un pourcentage de G + C compris entre 30 et 60% (Stiles & Holzapfel, 1997) et une taille de génome comprise entre 1,8 et 3,3 Mpb. Les bactéries lactiques se caractérisent par de faibles activités protéolytique et lipolytique et sont très exigeantes en acides aminés et en vitamine B (Caplice & Fitzgerald, 1999). Elles sont ubiquistes et se trouvent soit libres dans l'environnement, soit en association avec un hôte.

Le principal atout que représentent les bactéries lactiques pour l'industrie alimentaire, réside dans l'amélioration de la qualité des produits fermentés en y développant certaines

caractéristiques organoleptiques et en augmentant leur durée de conservation (Stiles, 1996). Elles participent à l'inhibition de certains microorganismes pathogènes, en produisant plusieurs métabolites ayant une activité antimicrobienne (Dortu & Thonart, 2009; Moraes *et al.*, 2010).

2. Historique et taxonomie

Les bactéries lactiques sont de très anciens micro-organismes découverts dans des sédiments datant de 2,75 milliards d'années, avant l'apparition de l'oxygène dans l'atmosphère ce qui pourrait expliquer leur caractère anaérobie (Quiberoni *et al.*, 2001). Elles sont apparues avant les cyanobactéries photosynthétiques (Quiberoni *et al.*, 2001; Drider & Prevost, 2009).

La classification phénotypique des bactéries lactiques est fondée sur la morphologie, la croissance à différentes températures, le mode de fermentation des sucres, la capacité de croissance à différentes concentrations de sel, la tolérance aux pH acides et alcalins, la configuration de l'acide lactique, l'hydrolyse de l'arginine et la formation d'acétoïne. Par ailleurs, une classification selon la composition de la paroi cellulaire (de Ambrosini *et al.*, 1996) incluant la nature des acides gras qui la composent, a été proposée (Gilarová *et al.*, 1994; König & Fröhlich, 2009). Une autre classification, basée sur la nature des produits du métabolisme bactérien obtenus à partir des glucides a subdivisé les bactéries lactiques en trois groupes (McLeod *et al.*, 2008). Le groupe I renferme majoritairement les Lactobacilles homofermentaires. Le groupe II contient les bactéries hétérofermentaires et regroupe les espèces des genres *Leuconostoc*, *Oenococcus*, et *Weissella*, ainsi que quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus*. Le groupe III regroupe quant à lui quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus* et la majorité des espèces appartenant aux genres *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*. Ce dernier qui occupe une position intermédiaire entre les groupes I et II, renferment ainsi des espèces capables d'être homo- ou hétérofermentaires selon les conditions environnementales (McLeod *et al.*, 2008).

Selon la seconde édition de Bergey's manual of systematic bacteriology (Vos *et al.*, 2009), les bactéries lactiques sont classées dans le phylum des Firmicutes, la Classe des Bacilli et l'Ordre des Lactobacillales renfermant trente-cinq genres répartis en six familles : *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* et *Streptococcaceae*. Seuls douze genres sont utilisés en technologie alimentaire (Figure 1), il s'agit de : *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*,

Oenococcus, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus* et *Weissella* (Vandamme *et al.*, 1996).

L'appellation bactérie lactique est aussi souvent étendue aux genres *Bifidobacterium*, *Macrococcus*, *Brevibacterium* et *Propionibacterium* qui leur sont apparentés et qui sont également utilisés pour la fabrication de divers produits fermentés (Klaenhammer *et al.*, 2005; Pfeiler & Klaenhammer, 2007). Ils bénéficient également du statut GRAS (Adams & Marteau, 1995; Klaenhammer *et al.*, 2005). Quelques espèces du genre *Streptococcus*, *Enterococcus* et certains *Lactobacillus* sont néanmoins considérées comme des pathogènes opportunistes pouvant provoquer des maladies (Aguirre & Collins, 1993; König & Fröhlich, 2009).

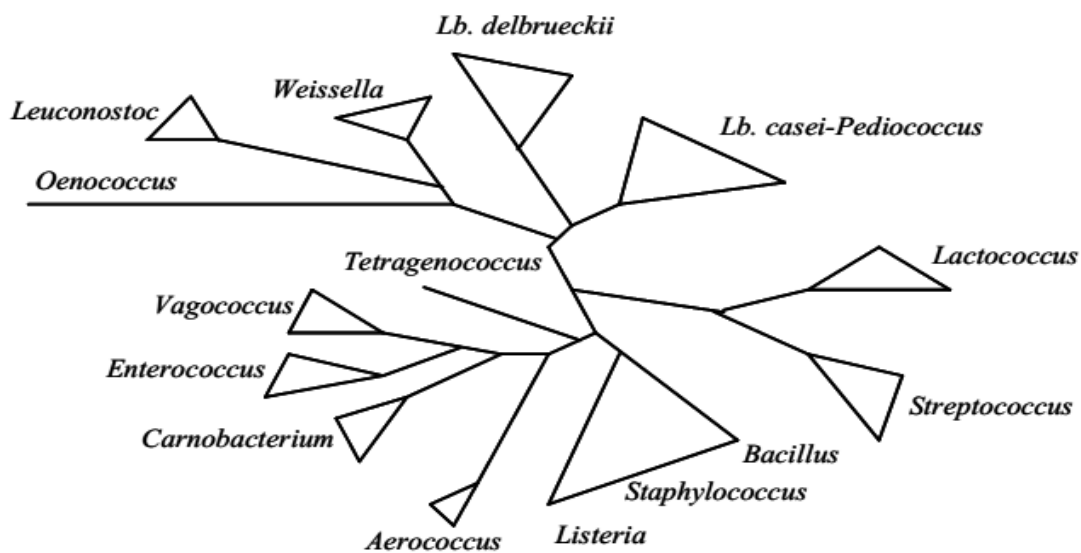


Figure 1. Arbre phylogénique des bactéries lactiques avec les genres *Aerococcus*, *Bacillus*, *Listeria* et *Staphylococcus* (Axelsson, 2004)

3. Propriétés technologiques

a. Capacité acidifiante

Les bactéries lactiques possèdent de nombreuses propriétés technologiques qui en font les premiers intervenants dans l'élaboration des aliments fermentés (Stiles & Holzapfel, 1997). Elles interviennent par fermentation des substrats, en transformant les glucides en acide lactique. Suivant les espèces, les sucres sont ensuite catabolisés selon deux voies différentes : soit la voie homofermentaire, soit la voie hétérofermentaire (Figure 2).

- La voie homofermentaire ou voie d'Embden-Meyerhoff Parnas (EMP) :

Elle est généralement associée aux bactéries des genres *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* et *Lactobacillus*. Celles-ci utilisent la glycolyse pour dégrader les hexoses. En conditions optimales de croissance, cette voie produit deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée. Pour être qualifiée d'homolactique, cette voie doit convertir au moins 90 % du glucose consommé en lactate. D'autres sucres que le glucose peuvent également être fermentés via cette voie : monosaccharides, disaccharides, hexitols (Thompson & Gentry-Weeks, 1994). Dans les conditions défavorables (milieu appauvri, souches mutées), ces bactéries lactiques homofermentaires peuvent présenter un métabolisme mixte, caractérisé par la production d'acide lactique, d'acide acétique, d'éthanol et d'acide formique et/ou de CO₂ (Cocaign-Bousquet *et al.*, 1996; Mozzi *et al.*, 2010).

- La voie hétérofermentaire :

Les principaux groupes de bactéries présentant ce type de métabolisme sont les *Leuconostocs* et certains *lactobacilles*. Ces bactéries utilisent la voie des pentoses phosphate (ou 6-phosphogluconate) qui permet l'obtention en plus d'une molécule l'acide lactique, de CO₂, d'une molécule d'ATP et d'une molécule d'éthanol ou de l'acétate, à partir d'une molécule de glucose (Thompson & Gentry-Weeks, 1994; Salminen *et al.*, 2004). La voie fermentaire bifide (ou voie de la fructose-6-P phosphocétolase FPC) est une voie empruntée par les bactéries du genre *Bifidobacterium*. Pour une molécule d'hexose consommée, cette voie produit 1,5 molécule d'acétate et 2,5 molécules d'ATP (Dridier & Prevost, 2009).

Grace à la production d'acides, les bactéries lactiques jouent un rôle primordial dans la fermentation des produits alimentaires, ainsi que dans leur conservation. Elles sont utilisées en tant que ferments. Au fur et à mesure du processus, la quantité d'acide lactique augmente, le milieu devient de plus en plus acide et le produit devient stable, ce qui permet une conservation prolongée de l'aliment (Abee *et al.*, 1995; Hugenholtz & Kleerebezem, 1999). L'acidification des aliments présente plusieurs avantages: elle fait précipiter les protéines, ce qui rend les aliments plus digestes, elle prolonge leur durée de conservation en limitant la prolifération des micro-organismes responsables d'altérations. Elle contribue également au développement des arômes. Pour des applications agroalimentaires, les souches utilisées doivent répondre à certains critères tels que: l'absence de pathogénicité ou de facteurs de virulence, la capacité d'améliorer les caractéristiques organoleptiques de l'aliment, la facilité de culture et de conservation et le maintien des propriétés désirables durant le stockage (Marth & Steele, 2001).

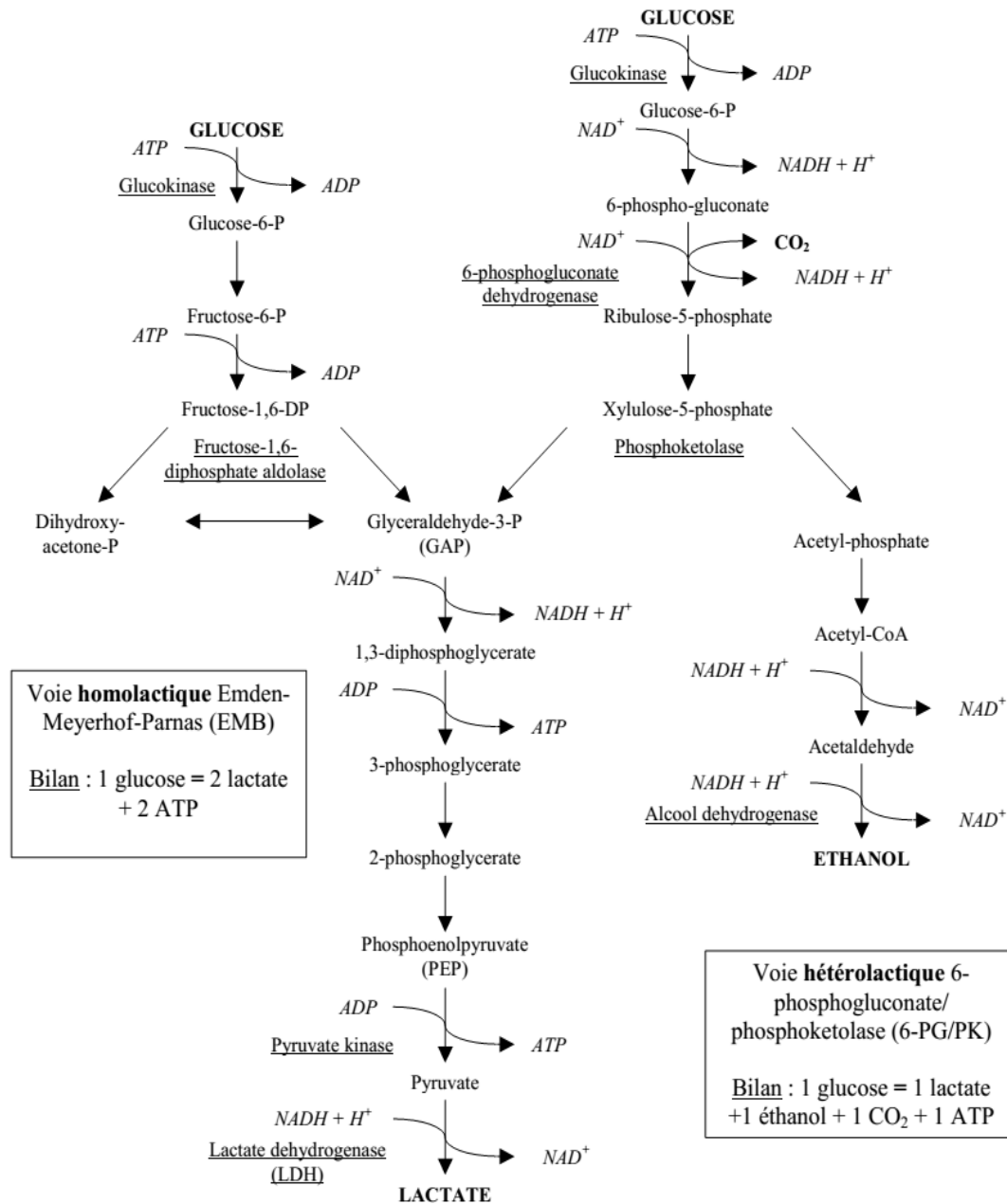


Figure 2. Principales voies cataboliques du glucose chez les bactéries lactiques (Dellaglio *et al.*, 1994).

b. Capacité texturante

Certaines souches de bactéries lactiques ont la capacité de synthétiser des exopolysaccharides (EPS) qui jouent un rôle important dans la texture et la rhéologie des produits transformés. La présence de ces souches productrices d'EPS dans les produits fermentés présente un intérêt technologique important pour les différentes industries de la fermentation,

notamment laitière. Elles permettent ainsi d'améliorer la texture (Ricciardi & Clement , 2000), de diminuer la synérèse et d'augmenter la viscosité et l'onctuosité du produit. Les EPS ont la capacité de retenir les molécules d'eau et de diminuer la séparation du lactosérum et des caséines coagulées du lait. Leur présence dans les yaourts améliore leur homogénéité (Desmazeaud, 1990). La majorité des études portant sur la production d'EPS par les bactéries lactiques portent sur les genres *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* (Ruas & de Los Reyes, 2005; Badel *et al.*, 2011).

Les bactéries lactiques produisent deux types d'EPS: les homopolysaccharides et les hétéropolysaccharides. Les dextrans et les glucanes produits respectivement par *Leuconostoc mesenteroides* et *Streptococcus mutans* sont des homopolysaccharides de glucose tandis que les levanes produits par *Streptococcus salivarius* sont des homopolysaccharides de fructose. Les hétéropolysaccharides contenant deux ou plusieurs types d'oses constitutifs forment un groupe très hétérogène de polysaccharides élaborés par différentes bactéries lactiques thermophiles et mésophiles (Cerning, 1994).

c. Capacité aromatisante

La production de composés aromatiques est liée à l'activité microbienne. Plusieurs espèces de bactéries lactiques, telles que *L. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* et *L. mesenteroides* ssp. *cremoris* sont capables de synthétiser, à partir du citrate notamment, divers composés tels que le diacétyl, l'acétoïne, l'acétate, principaux composés responsables de l'arôme des produits laitiers fermentés (Leveau, 1991)

D'autres travaux (Tanous *et al.*, 2005; Tanous *et al.*, 2006) ont montré la capacité de certaines bactéries lactiques à convertir les acides aminés en molécules aromatiques, ce qui permet de diversifier les arômes des produits dans lesquels se développent ces bactéries (Gripion & Yvon, 1998).

d. Effet sur la santé (caractère probiotique)

Parmi les nombreuses définitions formulées au cours des dernières décennies, on peut retenir celle qui présente les probiotiques comme des microorganismes vivants, qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent un effet potentiellement bénéfique sur la santé de l'hôte (FAO/OMS, 2001). Beaucoup de travaux ont mis en évidence les bienfaits des

probiotiques sur la santé humaine (Gibson *et al.*, 1998; Amaraa & Shibli, 2015; Bultosa, 2016; Zuppa *et al.*, 2016).

De nombreuses souches de bactéries lactiques, telles que *E. faecium* J96 (Carina *et al.*, 2000), *B. longum* (Schell *et al.*, 2002), *L. acidophilus* NCFM (Altermann *et al.*, 2005) ...sont considérées comme probiotiques. Les principales propriétés recherchées chez les probiotiques sont la résistance aux acides gastriques et aux sels biliaires (Klaenhammer & Kullen, 1999) et l'activité immunomodulatrice (Gourbeyre *et al.*, 2011). En effet, bien que non pathogènes, leur "appartenance bactérienne" stimule le système immunitaire par l'augmentation du nombre de phagocytes et de lymphocytes, premiers outils de défense contre tout agent exogène (Donnet-Hughes *et al.*, 1999). Ils aident ainsi au développement du système immunitaire chez le nourrisson et l'améliorent chez les personnes fragiles et âgées (Hessle *et al.*, 1999; Cross *et al.*, 2001). Les probiotiques participent également au renforcement de la muqueuse intestinale en stimulant la production du mucus par cette dernière. De plus, par l'assimilation de certains composés alimentaires indigestes (fibres alimentaires, lactose chez certaines personnes, etc.), ils aident à l'amélioration du transit intestinal et à la régulation de la flore endogène (Vieira da Silva *et al.*, 2016).

Différentes études ont par ailleurs suggéré un possible rôle des probiotiques dans la prévention du cancer et ceci par la production d'enzymes et d'anti-oxydants (Rowland, 2004; Commane *et al.*, 2005). Ces derniers agiraient en détruisant certains radicaux libres, composés favorisant le développement de cellules cancéreuses. D'autres études sur les souches probiotiques *L. acidophilus* et *L. casei*, ont montré leur efficacité contre la diarrhée (Kelleher *et al.*, 2002; Penner *et al.*, 2005).

Enfin, la production de substances antimicrobiennes (bactériocines) est l'une des caractéristiques des probiotiques qui a connu un intérêt croissant ces dernières décennies (Gillors *et al.*, 2008). Les probiotiques bactériocinogènes permettent l'inhibition de certaines souches spécifiques pathogènes ou pouvant altérer la flore intestinale endogène. C'est le cas par exemple de *B. bifidum* NCDC 1452 qui produit une bactériocine, la bifidine (Anand *et al.*, 1984). Kang *et al.*, (1989) ont par ailleurs décrit une souche de *B. longum* produisant un peptide antimicrobien dénommé bifilong, capable d'inhiber certaines bactéries à Gram-négatif ou à Gram-positif. De leur côté, Touré *et al.*, (2003) ont isolé des souches de bifidobactéries à partir de fèces de nourrissons qui ont révélé une activité antagoniste contre *L. monocytogenes*.

Les probiotiques sont utilisés dans un grand choix d'aliments fermentés. Dans les différentes applications alimentaires des probiotiques, ce sont les genres *Lactobacillus* et

Bifidobacterium qui dominent, en raison de leur appartenance à la flore endogène humaine, mais également en raison de l'absence quasi-systématique de facteurs de virulence chez ces bactéries. Les lactobacilles sont néanmoins les plus populaires grâce à leur utilisation intensive dans les produits fermentés. Ainsi, les deux espèces *B. lactis* et *L. casei* sont utilisées comme compléments dans certains produits fermentés. L'utilisation de souches du genre *Enterococcus* en tant que probiotiques est néanmoins très restreinte du fait de l'association souvent faite de leur présence à une contamination fécale. Ces souches sont donc plus souvent utilisées comme probiotiques pour les animaux (Izquierdo, 2009).

Par ailleurs, en raison de leurs propriétés thérapeutiques, les probiotiques sont utilisés dans certaines préparations pharmaceutiques en association avec des traitements médicamenteux (Saarela *et al.*, 2000). Reid *et al.*, ont initié, en 2003, des travaux sur l'association de probiotiques aux antibiotiques en vue de limiter les infections à *Helicobacter pylori*, bactérie fréquemment impliquée dans la survenue des gastrites et ulcères gastro-duodénaux

4. Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont connues et utilisées pour les effets antagonistes qu'elles peuvent avoir. Ceux-ci résultent de la production de différents composés organiques et non-organiques capables d'inhiber ou de limiter la croissance de certains germes pathogènes.

a. Acides organiques

Qu'elles soient homofermentaires ou hétérofermentaires, les bactéries lactiques produisent différents types d'acides organiques. Grâce à cette production, le pH du milieu dans lequel les bactéries lactiques se multiplient diminue, permettant ainsi l'inhibition d'une partie de la flore qui s'y développe et qui pourrait être indésirable dans l'aliment sur le plan hygiénique.

b. Peroxyde d'hydrogène

La catalase, enzyme nécessaire à la dégradation du peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau, est absente chez les bactéries lactiques. Il en résulte une accumulation de ce composé qui peut être inhibiteur de différents micro-organismes (Zalan *et al.*, 2005). En effet, son action peut se manifester aussi bien sur les germes indésirables que sur ceux indispensables au bon déroulement de la fermentation. L'inhibition, se fait par l'oxydation des lipides membranaires des souches cibles et/ou par la destruction des structures protéiques cellulaires (Zalan *et al.*, 2005).

Certaines bactéries lactiques synthétisent la catalase hexamérique ou tétramérique, on parle de pseudocatalases. Celles-ci contiennent du manganèse, ce qui permet de protéger ces bactéries contre leur propre peroxyde d'hydrogène (Strus *et al.*, 2006).

c. Dioxyde de carbone

Il est formé essentiellement, au cours de la fermentation hétérolactique. En créant un environnement anaérobie, il inhibe les microorganismes aérobies. Son accumulation dans la bicouche lipidique peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité membranaire (Ammor *et al.*, 2006).

d. Diacétyl

Le diacétyl est un composé aromatique essentiel. Plusieurs bactéries des genres *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* et *Pediococcus*, peuvent le synthétiser (Leveau, 1991). Sa capacité inhibitrice se manifeste vis-à-vis des levures, des bactéries à Gram-négatif, les bactéries à Gram-positif non lactiques sont quant-à elles moins sensibles (El-Ziney *et al.*, 1998).

e. Reutéline

La reutéline (ou 3-hydroxypropionaldéhyde) est un métabolite intermédiaire qui possède un effet antimicrobien. Il est produit lors de la fermentation anaérobie du glycérol par certaines espèces de *Lactobacillus* ainsi que par d'autres genres bactériens non lactiques tels que *Bacillus*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Clostridium* (El-Ziney *et al.*, 1998). La reutéline possède un large spectre d'activité et a des applications aussi bien dans le domaine médical que dans le domaine alimentaire (Vollenweider, 2004). Elle interfère avec la réplication de l'ADN chez les procaryotes (Gram-positif ou Gram-négatif), les eucaryotes, les virus, les champignons et les protozoaires.

f. Bactériocines

Les bactériocines sont des peptides avec une activité bactéricide contre les espèces proches de la souche productrice. Elles représentent une large gamme de peptides qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'activité et de leur mode d'action (Klaenhammer, 1988).

II. Bactériocines produites par les bactéries lactiques

1. Généralités

La première découverte des bactériocines a été signalée il y a presque un siècle, lorsque Gratia (1925) a démontré l'inhibition de souches *d'Escherichia coli* S par une substance thermostable provenant d'une culture d'*E. coli* V. Ces substances inhibitrices ont été appelées colicines en références à l'espèce productrice (Frederiq, 1946). L'inhibition de la croissance de différentes bactéries lactiques par un métabolite produit par *S. lactis*, aujourd'hui classifié comme *L. lactis* (McAuliffe *et al.*, 2001), est à la base de la découverte de la première bactériocine produite par une bactérie lactique, et ceci en 1928 (Rogers, 1928). Celle-ci a été décrite par Whitehead cinq ans plus tard et en 1947, elle a été nommée nisine (Mattick & Hirsch, 1947). En 1951, d'autres travaux ont prouvé qu'au cours de l'affinage d'un fromage, les clostridies étaient inhibées par la nisine (Hirsch *et al.*, 1951). C'est à partir de cette date que l'usage des bactériocines a été recommandé dans la lutte contre les contaminations alimentaires. Selon Klaenhammer (1988) et Margaret & John (2002), 99% des espèces bactériennes peuvent produire au moins une bactériocine.

La définition d'une bactériocine a considérablement évolué au cours des années. Aujourd'hui, les bactériocines sont définies comme des petits peptides antimicrobiens synthétisés par voie ribosomique et produits par des bactéries qui sont immunisées contre leurs propres bactériocines (Cotter *et al.*, 2013). Leur activité peut être restreinte à des souches de la même espèce ou s'étendre jusqu'à atteindre de nombreuses espèces et genres différents (Cotter *et al.*, 2005). L'effet est généralement bactéricide, mais un effet bactériostatique a été constaté (Tagg & Wannamaker, 1976; Klaenhammer, 1988). Les bactériocines sont de nature cationique et sont généralement organisées en une ou plusieurs structures hélicoïdales amphiphiles (Rodriguez *et al.*, 2003; Heng *et al.*, 2007). Leur nature protéique permet leur dégradation par les enzymes protéolytiques en particulier les protéases du tractus gastro-intestinal des mammifères, ce qui les rend sans danger pour la consommation humaine (Zacharof & Lovittb, 2012).

La famille des bactériocines est très diverse, deux grands groupes peuvent être différenciés. D'une part, les bactériocines produites par des bactéries à Gram négatif, principalement représentées par les colicines et les microcines. Leur masse moléculaire est supérieure à 20 kDa et contiennent généralement entre 449 à 629 acides aminés (Margaret & John, 2002). Elles ont un large spectre d'activité, sont résistantes à la chaleur, à certaines protéases, ainsi qu'aux pH extrêmes (Baquero & Moreno, 1984; Pons *et al.*, 2002). Elles servent

comme système modèle pour des études sur les bactériocines, telles que les relations structure-fonction (Cascales *et al.*, 2007). De nombreux travaux ont porté sur les microcines, produites par des souches d'entérobactéries, du fait de leurs applications thérapeutiques potentielles (Asensio & Perez-Diaz, 1976).

D'autre part, les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont les plus abondantes (Margaret & John, 2002) et sont les plus étudiées, en raison de leur statut GRAS (Settanni & Corsetti, 2008; Zacharof & Lovittb, 2012). Ces bactériocines sont généralement de faible masse moléculaire (rarement plus de 10 kDa) (Heng *et al.*, 2007; Zacharof & Lovittb, 2012).

Les bactériocines ne sont pas des antibiotiques, mais peuvent, en revanche, être une alternative viable aux antibiotiques (Cotter *et al.*, 2013). La différence majeure entre les antibiotiques et les bactériocines est que ces dernières sont synthétisées par voie ribosomique et produites au cours de la phase primaire de la croissance alors que les antibiotiques sont, en majorité, des métabolites secondaires (Zacharof & Lovittb, 2012). En outre, les bactériocines ont des spectres d'activités relativement étroits comparés à ceux constatés chez les antibiotiques (Margaret & John, 2002; Zacharof & Lovittb, 2012).

2. Classification

La classification des bactériocines des bactéries à Gram positif a été revue plusieurs fois au fur et à mesure de la découverte de nouvelles structures (Klaenhammer, 1993; Ennahar *et al.*, 2000; McAuliffe *et al.*, 2001; Cotter *et al.*, 2005; Nes *et al.*, 2007). Au-delà des particularités structurales, le poids moléculaire, le mécanisme d'action et l'origine du producteur sont également des critères qui ont été pris en compte par différents auteurs (Diep & Nes, 2002; Peschel & Sahl, 2006; Izquierdo *et al.*, 2008). Néanmoins, la prise en compte de tous ces critères pour les bactériocines conduit parfois à des classifications dans plus d'une classe à la fois (Tableau 1), à l'absence de classification, ou encore à l'identification d'une même bactériocine avec différents noms (Nes *et al.*, 2007 ; Abdelmajid *et al.*, 2010).

Tableau 1. Bactériocines placées dans plus d'une sous-classe selon la classification (Abdelmajid *et al.*, 2010)

Bactériocines	Classes	Références
Bacteriocin 31	Class IIa	(Jack <i>et al.</i> , 1995)
	Class IIb	(Eijsink <i>et al.</i> , 2002)
	Class IIc	(Nes <i>et al.</i> , 1996)
	IIc Sec Dependent Bacteriocin	(Ennahar <i>et al.</i> , 2000)
Cacnobacteriocin A	Class IIc	(Eijsink <i>et al.</i> , 2002)
	Class IIc	(Eijsink <i>et al.</i> , 1998)
	Non subgroup bacteriocin	(Ennahar <i>et al.</i> , 2000)
Carnobacteriocin BM1	Class IIa	(Jack <i>et al.</i> , 1995)
	Class IIb	(Eijsink <i>et al.</i> , 2002)
Curvacin A	Class IIa	(Eijsink <i>et al.</i> , 2002)
	Class IIb	(Eijsink <i>et al.</i> , 2002)
Divergicin A	Class IIc	(Eijsink <i>et al.</i> , 2002)
	Sec dependent Bacteriocin	(Ennahar <i>et al.</i> , 2000)
Enterocin B	Class IIc	(Eijsink <i>et al.</i> , 2002)
	Class IIc	(Eijsink <i>et al.</i> , 1998)
Enterocin P	Class IIc	(Jack <i>et al.</i> , 1995)
	Class IIb	(Ennahar <i>et al.</i> , 2000)
	Class IIc	(Eijsink <i>et al.</i> , 2002)
	Class IIb	(Eijsink <i>et al.</i> , 1998)
Lacticin F lafA	Class IIc	(Eijsink <i>et al.</i> , 1998)
	Class IIb	(Eijsink <i>et al.</i> , 2002)
Lactobin A (Amylovorin-L4)	Class IIc	(Nes <i>et al.</i> , 1996)
	Non Subgroup Bacteriocin	(Eijsink <i>et al.</i> , 2002)
Lactocin 705	Class IIb	(Ennahar <i>et al.</i> , 2000)
	Class IIc	(Nes <i>et al.</i> , 1996)
Lactococcin B	Class IIc	(Eijsink <i>et al.</i> , 2002)
	Class IIc	(Eijsink <i>et al.</i> , 1998)
	Non Subgroup Bacteriocin	(Ennahar <i>et al.</i> , 2000)
Lactococcin G beta	Class IIb	(Kaiser & Montville, 1996)
	Class IIc	(Eijsink <i>et al.</i> , 2002)
Leucocin A	Class IIa	(Jack <i>et al.</i> , 1995)
	Class IIb	(Eijsink <i>et al.</i> , 2002)
Listeriocin 743A	Class IIa	(Jack <i>et al.</i> , 1995)
	Sec Dependent Bacteriocin	(Ennahar <i>et al.</i> , 2000)
Pln F	Class IIb	(Eijsink <i>et al.</i> , 1998)
	Class IIc	(Eijsink <i>et al.</i> , 2002)
Pln J	Class IIb	(Eijsink <i>et al.</i> , 2002)
	Class IIc	(Eijsink <i>et al.</i> , 2002)
Sakacin A	Class IIa	(Eijsink <i>et al.</i> , 1998)
	Class IIb	(Eijsink <i>et al.</i> , 2002)
Sakacin P	Class IIa	(Jack <i>et al.</i> , 1995)
	Class IIb	(Eijsink <i>et al.</i> , 2002)

La classification de Klaenhammer (1993) reste la classification de base, la plus modifiée. Les bactériocines sont divisées en quatre classes principales: la **classe I** comprenant les lantibiotiques, en raison de la présence de résidus lanthionine et 3'-méthyllanthionine. Elle regroupe les bactériocines modifiées post traductionnellement et est subdivisée en plusieurs groupes en fonction de leur structure la **classe II** comprenant les bactériocines thermostables non modifiées, cette classe a été subdivisée en trois sous-classes, la **classe III** comprenant les bactériocines thermolabiles de grande taille et la **classe IV** bactériocines plus complexes composées de protéines et portant une (ou plusieurs) composantes non-protéique, lipidique et/ou oligosaccharidique (Klaenhammer, 1993). Certains auteurs (Cotter *et al.*, 2005; Nes *et al.*, 2007) ont suggéré d'exclure la classe III de la classification, puisque l'activité des bactériocines de cette classe s'apparente plus à une activité enzymatique qu'à une action antimicrobienne. A son tour, la classe IV n'étant pas clairement caractérisée, Diep et Nes (2002) ont préféré l'écarter et la considérer comme inappropriée dans cette classification.

D'autres auteurs, (Diep & Nes, 2002; Drider *et al.*, 2011; Cotter *et al.*, 2013) ont proposé une classification regroupant les bactériocines en deux groupes principaux. La **classe I** appelée la classe des lantibiotiques. Il est important de souligner que la présence des résidus lanthionine dans un peptide n'en fait pas automatiquement un lantibiotique. En effet, tous les peptides qui en possèdent, ne sont pas doués d'une activité antimicrobienne (Jack *et al.*, 1995). Ainsi, le SAPB, l'AMF et le Sapt sécrétés respectivement par *S. coelicolor* ; *S. griseus* et *S. tendae* sont des peptides contenant des résidus lanthionine, mais ils ne présentent aucune activité antimicrobienne connue (Ueda *et al.*, 2002; Kodani *et al.*, 2004; Kodani *et al.*, 2005). Quant-à la **classe II**, elle regroupe les bactériocines non modifiées (<10 kDa) contenant les résidus d'acides aminés standard (qui peuvent être liés par des ponts disulfure ou cyclisés entre les extrémités N-terminale et C-terminale) (Abdelmajid *et al.*, 2010). Elle est subdivisée en quatre sous-groupes : la classe IIa des « pediocin-like », la classe IIb des « two-peptides », la classe IIc des bactériocines circulaires et la classe IId des bactériocines non modifiées et non «pediocin-like». La classe III, reste très marginale dans cette classification, la classe IV quant à elle, n'existe pas. Elles rentrent pas dans la nouvelle classification admise des bactériocines.

2.1. Classe I : Lantibiotiques

Il s'agit de petits peptides, entre 19 et 38 acides aminés, de masse inférieure à 5 kDa et ayant subi des modifications post-traductionnelles (Wiley & Van Der Donk, 2007). Les

modifications post-traductionnelles communes à tous les lantibiotiques impliquent la déshydratation des résidus sérine et thréonine du propeptide (région C-terminale), respectivement en déshydroalanine et déshydrobutyrine, qui peuvent ensuite former une liaison thioéther avec la cystéine afin de générer la lanthionine (Lan) et la β -méthyl-lanthionine (MeLan), respectivement (Lili & Van Der Donk, 2004; Nes *et al.*, 2007; Willey & Van Der Donk, 2007; Zacharof & Lovittb, 2012). Pas moins de 14 modifications post-traductionnelles différentes ont été documentées chez les lantibiotiques (Willey & Van Der Donk, 2007). La Lan et la MeLan sont des structures polycycliques uniques qui caractérisent les lantibiotiques (figure 3).

La nisine est le lantibiotique le plus étudié (Nes *et al.*, 2007). Sept variantes de nisine ont été isolées à ce jour, elles diffèrent par un ou plusieurs acides aminés (Cenatiempo *et al.*, 1996; Nes *et al.*, 2007). Les quatre variantes, nisine A, F, Q et Z ont été isolées chez *L. lactis*, les deux autres appelées nisine U et U2 ont été isolée chez *S. sp* (Piper *et al.* 2011). La nisine U présente une similitude de 78% avec la nisine A, la différence étant le manque des trois résidus C-terminaux (Wescombe *et al.*, 2006). La plus récente variante, la nisine H est isolée quant à elle d'une souche de *Streptococcus* (O'Connor *et al.*, 2015).

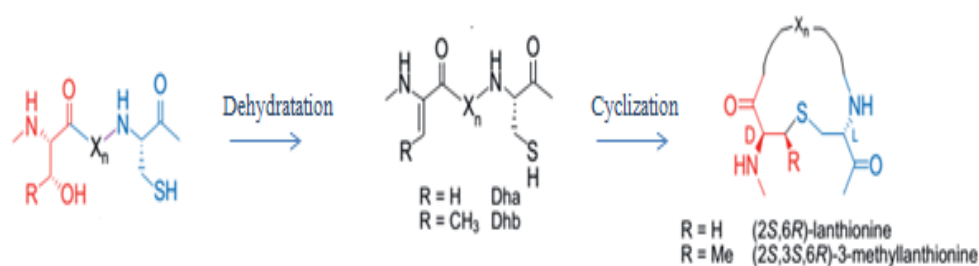
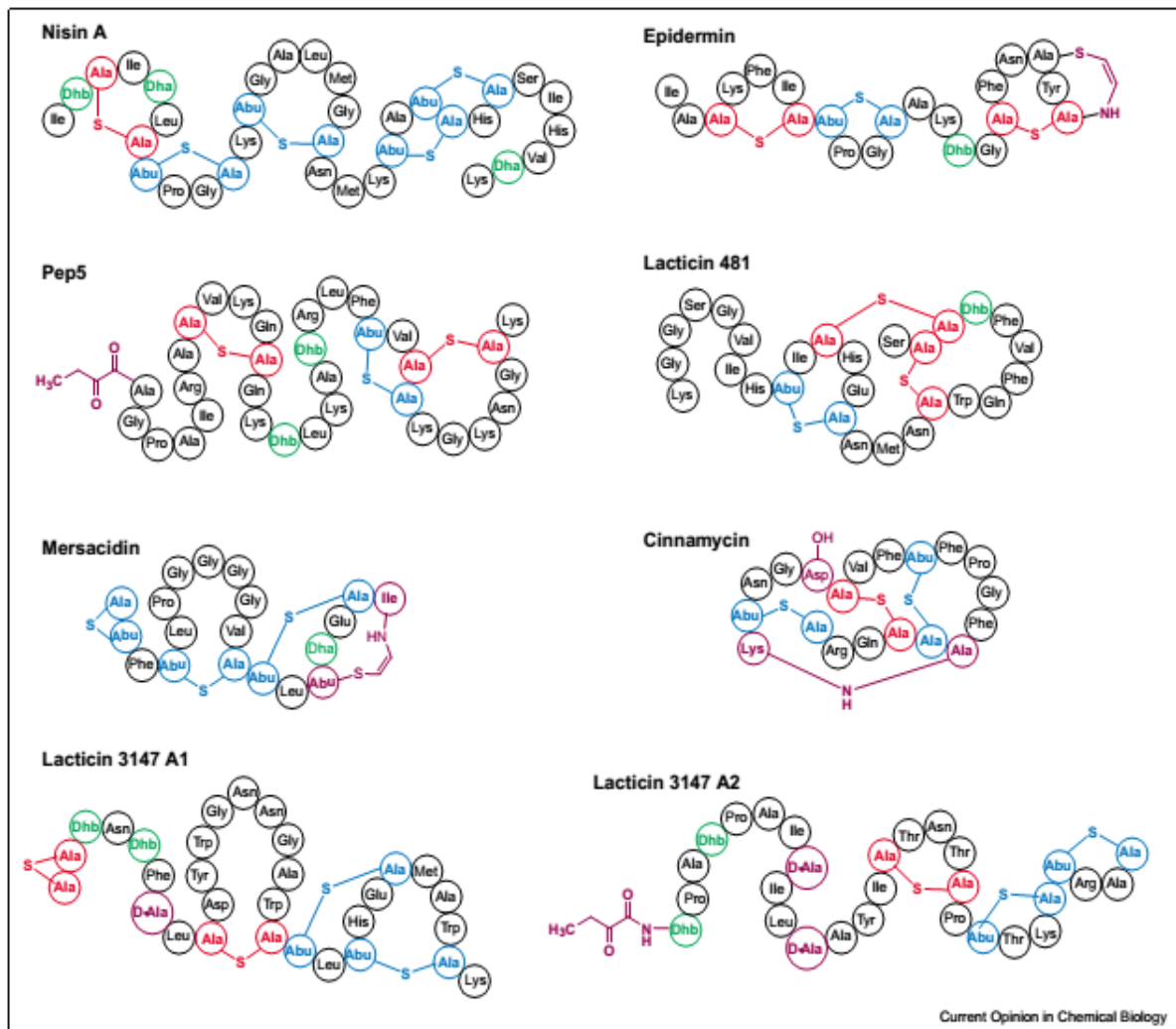


Figure 3. Formation des résidus Lanthionine (Lan) ou de Methyllanthionine (MeLan) dans le prépeptide lantibiotique (Willey & Van Der Donk, 2007)

En fonction des différences structurales liées à la localisation des ponts établis entre les acides aminés modifiés, les lantibiotiques sont scindés en deux sous-classes. La sous classe Ia, ou bien les lantibiotiques linéaires. Ils comprennent des molécules allongées en forme d'hélice α , chargées positivement, amphiphile et de masse moléculaire variant de 2 à 4 kDa (jusqu'à 34 acides aminés). Ils agissent par la formation de pores à travers la membrane cytoplasmique des cellules cibles sensibles (Dridier *et al.*, 2011; Zacharof & Lovittb, 2012). Cette sous-classe contient les bactériocines telles que la nisine, la subtilisine, le Pep5 et l'épidermine (Dridier *et al.*, 2011). La nisine, principale bactériocine représentative de ce groupe, est la seule bactériocine

utilisée comme agent de conservation alimentaire (Lili & Van Der Donk, 2004). La sous-classe Ib est constituée des lantibiotiques globulaires qui interfèrent avec des réactions enzymatiques cellulaires. Ils ont une masse moléculaire variant entre 2 et 3 kDa et une charge nette nulle ou négative (Deegan *et al.*, 2006; Cotter *et al.*, 2013). Une troisième sous-classe a été proposée, il s'agit de la sous-classe Ic (Bastos *et al.*, 2009) qui représente les lantibiotiques à deux composants comme la lacticine 3147 (McAuliffe *et al.*, 2001). Cette dernière est active par synergie entre les deux composants lacticine 3147 A1 et lacticine 3147 A2 (Dridier *et al.*, 2011)



2.2. Classe II : les bactériocines thermostables non modifiés

Les bactériocines de classe II constituent un groupe important et diversifié de peptides antimicrobiens de masses moléculaires inférieures à 10 kDa (Zacharof & Lovittb, 2012). Ils rassemblent les peptides thermostables ne présentant pas de modifications post-traductionnelles (Ennahar *et al.*, 2000; Nes *et al.*, 2007; Cui *et al.*, 2012). Cette classe est la plus hétérogène et

son étude a conduit à sa subdivision d'abord en trois sous-classes (IIa, IIb et IIc) (Klaenhammer, 1993) et ensuite en cinq sous-classes (IIa, IIb, IIc, IId et IIe) (Nes *et al.*, 2007).

a. La sous-classe IIa

Les bactériocines de cette classe IIa sont sans doute les bactériocines des bactéries lactiques les plus étudiées, aux côtés des lantibiotiques, principalement en raison de leur importante activité anti-*Listeria*. Il y a environ 50 bactériocines de classe IIa qui ont été caractérisées (Ennahar *et al.*, 2000; Cui *et al.*, 2012). Elles possèdent une forte activité contre *L. monocytogenes* à l'instar de la pédiocine PA-1 (ou AcH) d'où le nom : sous classe des « pediocin-like » (Bhunja *et al.*, 1988; Ennahar *et al.*, 1997; Zacharof & Lovittb, 2012). Les premières bactériocines, de cette sous-classe, à avoir été identifiées et bien caractérisées sont la pédiocine PA-1 (Ennahar *et al.*, 1996), l'entéroisine A (Aymerich *et al.*, 1996), la leucocine A-UAL 187 (Hastings *et al.*, 1991), la mésentéricine Y105 (Hechard *et al.*, 1992), la sakacine P (Tichaczek *et al.*, 1992) et la curvacine A (également appelée sakacine A) (Drider *et al.*, 2006). Elles ont une masse moléculaire moyenne inférieure à 5,5 kDa.

La structure primaire des bactériocines de la classe IIa est constituée d'une région C-terminale variable (hydrophobe et / ou amphiphile), d'une région N-terminale conservée (cationique et hydrophile) et d'un ou deux ponts disulfure dans dépendant du nombre de résidus cystéine présents (Ennahar *et al.*, 2000; Nes *et al.*, 2007). La région N-terminale renferme une séquence consensus YGNGV/L surnommée « motif anti-*Listeria* » ou « pediocin box » (Cenatiempo *et al.*, 1996; Ennahar *et al.*, 2000; Abdelmajid *et al.*, 2010). La présence de ce motif est l'une des principales caractéristiques des bactériocines de cette classe. Il semblerait qu'il fasse partie de la séquence de reconnaissance de la cellule cible (Fleury *et al.*, 1996) et qu'il ait un rôle dans l'interaction avec la paroi des espèces du genre *Listeria* et la mort de ces dernières (Cenatiempo *et al.*, 1996). Cependant, La présence de ce motif n'est bien sûr pas une condition à l'activité anti-*Listeria*, puisque de nombreuses bactériocines démunies de ce motif, telles que la nisine A (De Vos *et al.*, 1993), sont également active contre des espèces de ce genre. En se basant sur les motifs N-terminaux, de nouveaux sous-groupes peuvent apparaître (figure 5) (Cui *et al.*, 2012), et la séquence YGNG apparaît comme étant sans doute le vrai motif consensus (Eijsink *et al.*, 1998). Néanmoins, il existe des exceptions. Ainsi, certaines bactériocines, bien que ne possédant pas la séquence consensus typique (possèdent une séquence N-terminale altérée ou incomplète) (Ennahar *et al.*, 2000; Belguesmia *et al.*, 2011) sont classées dans la

classe IIa par certain auteurs, c'est le cas de la bactériocine OR-7 (Stern *et al.*, 2006), la bactériocine 31 et l'acidocine A (Ennahar *et al.*, 2000). L'alignement des séquences d'acides aminés des bactériocines de classe IIa, montrent un degré d'homologie assez élevé entre l'ensemble des bactériocine de cette classe (Cui, *et al.* 2012).

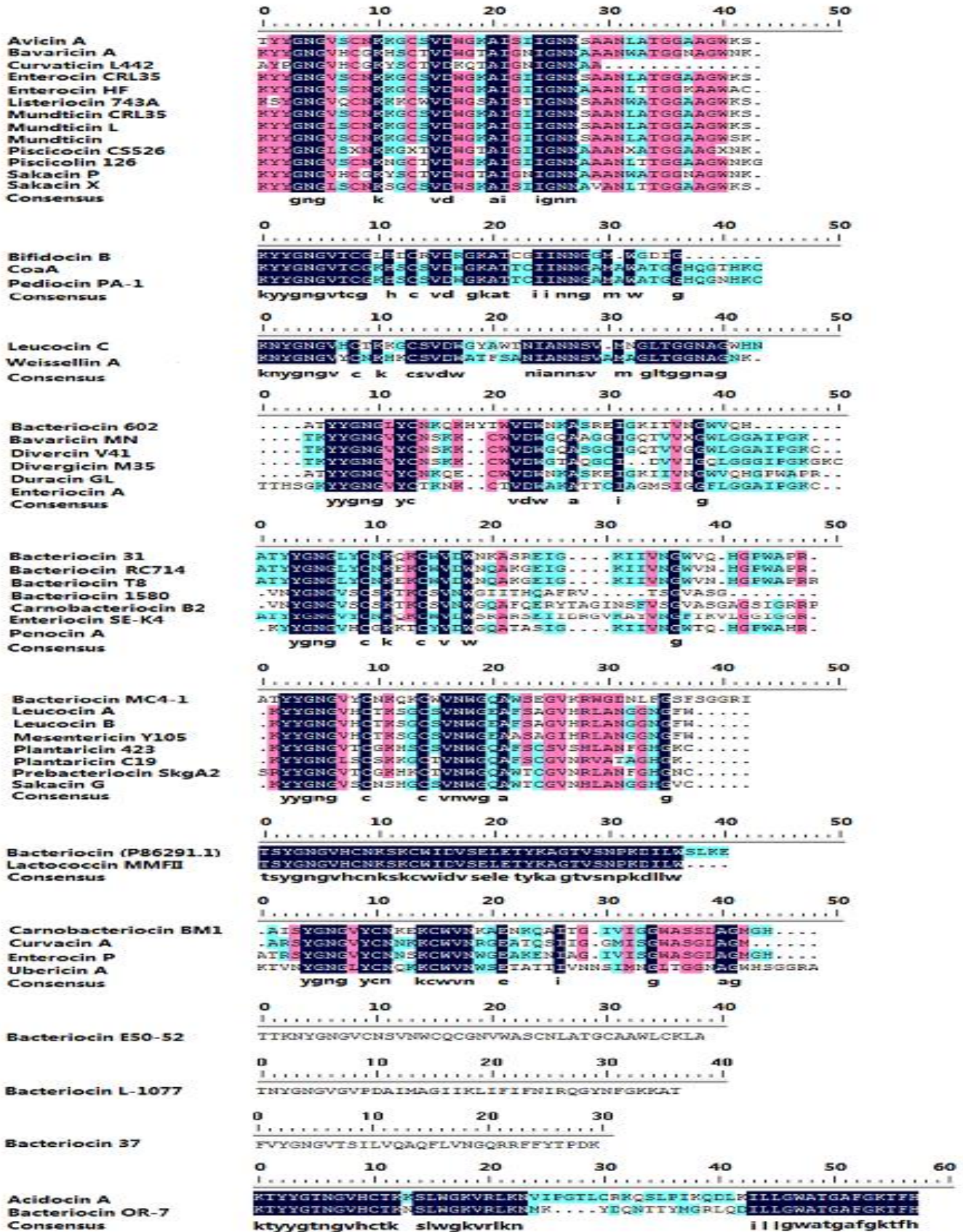


Figure 5. Alignement de séquences des bactériocines de la sous-classe IIa (Cui *et al.*, 2012)

Tableau 2. Séquences en acides aminés des bactériocines de la classe IIa

Bactériocine	Séquence d'acides aminés	Référence
Avicine A	TYYGNGVSCNKKGCSVDWGKAISIIGNNSAANLATGGAAGWKS	Birri <i>et al.</i> , 2010
Bavaricine A	KYYGNGVHXGKHSXTVDWGTAIGNIGNNAAANXATGXNAGG	Larsen <i>et al.</i> , 1993
Bavaricine MN	TKYYGNGVYCNKSKCWVDWQQAAGGIGQTVVXGWLGAIPGK	Kaiser et Montville, 1996
Coaguline	KYYGNGVTCGKHSCSVDWGKATTCIINNGAMAWATGGHQGTHKC	Le Marrec <i>et al.</i> , 2000
Divergicine M35	TKYYGNGVYCNKSKCWVDWGTAQGCIDVIGQLGGGIPGKGC	Tahiri <i>et al.</i> , 2004
Divercine V41	TKYYGNGVYCNKSKCWVDWQASGICIGQTVVGGWLGGAIPGKC	Métivier <i>et al.</i> , 1998
Entéroicine A	TTHSGKYGNGVYCTKNKCTVDWAKATTCIAGMSIGGFLGGAIPGKC	Aymerich <i>et al.</i> , 1996
Leucocine C	KNYGNGVHCTKKGCSVDWGKAWTNIANNMGLTGGNAGWHN	Fimland <i>et al.</i> , 2002a
Listériocine 743A	KSYGNGVHCNKKKCVDWGSIASTIGNNSAANWATGGAAGWKS	Kalmokoff <i>et al.</i> , 2001
Mundicine	KYYGNGVSCNKKGCSVDWGKAIGIIGNNSAANLATGGAAGWSK	Bennik <i>et al.</i> , 1998
Mundicine KS	KYYGNGVSCNKKGCSVDWGKAIGIIGNNSAANLATGGAAGWKS	Kawamoto <i>et al.</i> , 2002
Mundicine L	KYYGNGVSCNKKGCSVDWGKAIGIIGNNSAANLATGGAAGWKS	Feng <i>et al.</i> , 2009
Pédiocine PA-1	KYYGNGVTCGKHSCSVDWGKATTCIINNGAMAWATGGHQGNHKC	Ennahar <i>et al.</i> , 1996
Piscicoline 126	KYYGNGVSCNKGCSVDWKAIGIIGNNSAANLTTGGAAGWNKG	Jack <i>et al.</i> , 1996
Sakacine 5X	KYYGNGVSCNKGCSVDWKAISIIIGNNAVANLTTGGAAGWKS	Vaughan <i>et al.</i> , 200
Sakacine P	KYYGNGVHCGKHSCXTVDWGTAIGNIGNNAAANWATGGNAGWNK	Tichaczek <i>et al.</i> , 1994
Ubéricine A	KTVNYGNGLYCNKQKCWVNWSETATTIVNNSIMNGLTGGNAGWHSGGRA	Heng <i>et al.</i> , 2007
Lactococcine	MMFIITSYGNVHCNKSCKWIDVSELETYKAGTVSNPKDILW	Ferchichi <i>et al.</i> , 2001
Leucocine A	KYYGNGVHCTKSGCSVNWGEAFSAGVHRLANGGNGFW	Hastings <i>et al.</i> , 1991
Leucocine B	KYYGNGVHCTKSGCSVNWGEAFSAGVHRLANGGNGFW	Felix <i>et al.</i> , 1994
Mésentéricine Y105	KYYGNGVHCTKSGCSVNWGEAASAGIHLANGGNGFW	Fleury <i>et al.</i> , 1996
Plantaricine 423	KYYGNGVTCGKHSCSVDWGEAFSCSVSHLANFGNGKC	Van Reenen <i>et al.</i> , 2003
Plantaricine C19	KYYGNGVSCSKKGCCTVNWGQAFSCGVNRVATGGNGKX	Atrih <i>et al.</i> , 2001
Sakacine G	KYYGNGVSCNSHGCSVNWGQAWTCGVNHLANGGNGVC	Simon <i>et al.</i> , 2002
Carnobactériocine BM1	AISYNGVYCNKEKCWVNKAENKQAITGIVIGGWASSLAGMGH	Quadri <i>et al.</i> , 1994
Curvacine A	ARSYNGVYCNKCKWVNRGEATQSIIGMISGWASGLAGM	Tichaczek <i>et al.</i> , 1993
Entéroicine P	ATRSYNGVYCNNSKCWVNWGEAKENIAGIVISGWASGLAGMGH	Cintas <i>et al.</i> , 1997
Sakacine A	ARSYNGVYCNKCKWVNRGEATQSIIGMISGWASGLAGM	Holck <i>et al.</i> , 1992
Bactériocine 31	ATYYGNGLYCNKQKCWVDWNKASREIGKIVNGWVQHGPWAPR	Tomita <i>et al.</i> , 1996
Bactériocine RC714	ATYYGNGLYCNKEKCWVDWNQAKGEIGKIVNGWVNHGPWAP	del Campo <i>et al.</i> , 2001
Carnobactériocine B2	VNYGNGVSCSKTKCSVNWGQAFQERYTAGINSFVSGV ASGAGSIGRRP	Quadri <i>et al.</i> , 1994
Entéroicine SE-K4	ATYYGNGVYCNKQKCWVDWRSRARSEIIDRGVKAYVNGFTKVLGGIGGR	Eguchi <i>et al.</i> , 2001
Hiracine JM79	ATYYGNGLYCNKEKCWVDWNQAKGEIGKIVNGWVNHGPWAPRR	Sánchez <i>et al.</i> , 2007
Pénocine A	KYYGNGVHCGKKTCTCYVDWQATASIGKIVNGWTQHGPWAHR	Diep <i>et al.</i> , 2006

b. La sous-classe IIb

Cette classe est généralement appelée «two-peptide», elle regroupe les bactériocines formées de deux peptides non modifiés α et β (Tableau 3) (Nes *et al.*, 2007; Zacharof & Lovittb, 2012). L'activité antimicrobienne dépend de l'action synergique entre les deux peptides le plus souvent en quantité équimolaire (Garneau *et al.*, 2002; Nissen-Meyer *et al.*, 2009; Zacharof & Lovittb, 2012). Très souvent, ces peptides sont actifs individuellement (Anderssen *et al.*, 1998). Une bactériocine à deux peptides doit répondre à des conditions: l'activité des deux peptides combinés doit être plus importante que leurs activités individuelles et une seule protéine d'immunité est suffisante pour protéger la cellule productrice contre les deux peptides (Nes *et al.*, 2007). La séparation des peptides individuels d'une bactériocine de classe IIb s'avère souvent compliquée en raison de leurs propriétés souvent proches (Nes *et al.*, 2007). Ces bactériocines possèdent une taille très variable allant de 25 résidus pour plantaricine J à 62 résidus pour thermophile A. Comme les autres bactériocines de classe II, elles possèdent un spectre d'activité incluant de nombreux genres de bactéries à Gram positif potentiellement pathogènes et des bactéries lactiques telles que *Bacillus*, *Clostridium*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Pediococcus* (Garneau *et al.*, 2002). Ces bactériocines à deux peptides agissent sur la cible à des concentrations de l'ordre du pico ou du nano molaire, même si leurs peptides individuels n'affichent aucune activité à des concentrations plus élevées, de l'ordre des micromolaires (Nes *et al.*, 2007).

La lactococcine G, produite par *Lb. Lactis* (figure 6), est la première bactériocine à deux peptides à avoir été identifiée (Nissen-Meyer *et al.*, 1992). C'est la bactériocine la plus étudiée de cette classe (Moll *et al.*, 1996, 1998; Oppegård *et al.*, 2007; Rogne *et al.*, 2008). Elle est formée d'un peptide α (Lcn G α) de 39 acides aminés et d'un peptide β (Lcn G β) de 35 acides aminés (Rogne *et al.*, 2008).

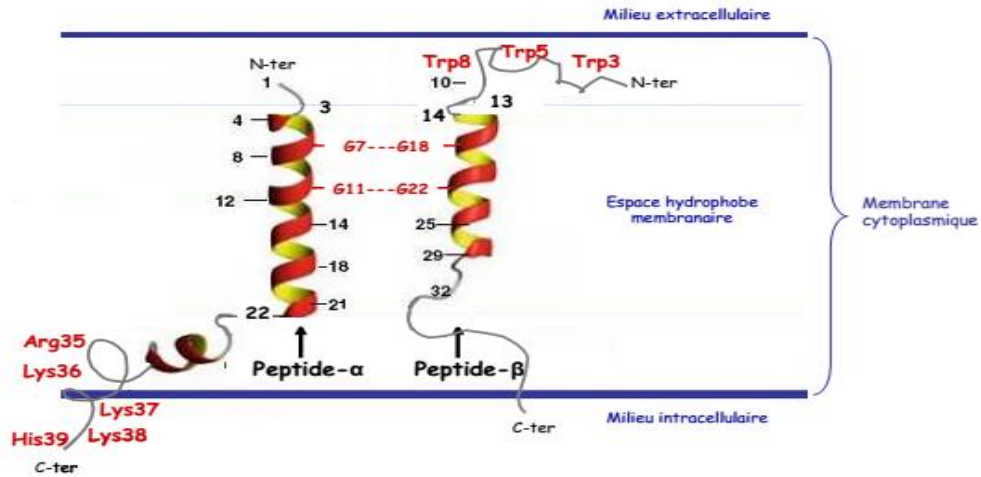


Figure 6. Modèle représentant les structures des des deux peptides constituant la lactococcine G ainsi que leur orientation dans la membrane des bactéries cibles (Oppegård *et al.*, 2010). Les liaisons hydrogènes et les interactions de Van der Waas entre les glycines (G7 et G18 / G11 et G12) sont représentées par des traits rouges en pointillés.

L'activité de la lactococcine dépend de l'action complémentaire de ces deux peptides α et β (figure 7). Ces derniers peuvent se lier fortement et de manière indépendante à la surface de la cellule cible, mais l'activité antimicrobienne nécessite l'action complémentaire des deux peptides dans un rapport molaire de 1: 1 afin qu'elle soit maximale (Nes *et al.*, 2007).

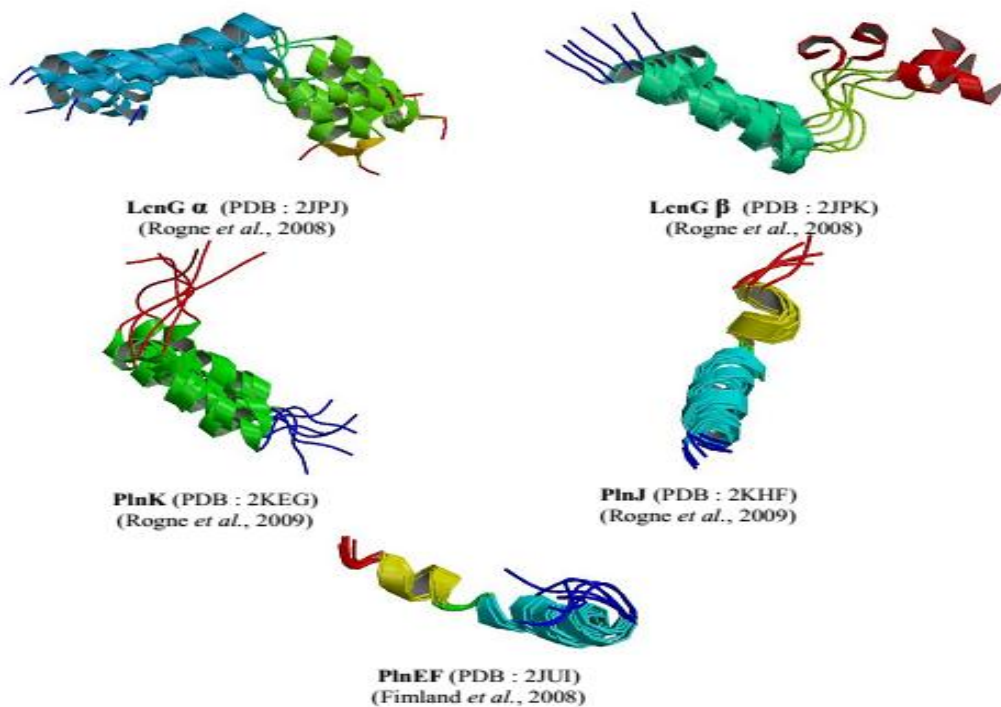


Figure 7. Modèle représentant les structures tridimensionnelles de la lactococcine G et des plantaricines EF et JK en contact avec des micelles

Tableau 3. Séquences en acides aminés de bactériocines à deux peptides de classe IIb

Bactériocine	Peptide	Séquence d'acides aminés	Producteur	Référence
Lactocine 705	Lac705 α	MDNLNKFKKLSDNKLQATIGGGMSGYIQGIPDFLKGYLHGISAANKHKKGRLLGY	<i>L. curvatus</i>	Cuozzo <i>et al.</i> , 2000
	Lac705 β	MESNKLEKFANISNKDLNKITGG GFWGGLGYIAGRVGAAAYGHAQASANNHHSPING		
Lactococcine G	LcnG α	MKELSEKELRECVGGGTWDDIGQGIGRVAYWVGKAMGNMSDVNQASRINRKKKH	<i>L. lactis</i>	Nes 2009
	LcnG β	MKNNNNNFFKDMMEIIEDGELVSITGGKKWGWLAWVDPAYEFIKGFGKGAIKEGNKDKWKNI		
Lactococcine Q	LcnQ α	MKELSEKELRECVGGSIWGDIGQGVGKAAAYWVGKAMGNMSDVNQASRINRKKKH	<i>L. lactis</i>	Zendo <i>et al.</i> , 2006
	LcnQ β	MKNNNNNFFKDMMEIIEDQELVSITGGKKWGWLAWVEPAGEFLKGFGKGAIKEGNKDKWKNI		
Lactacine F	Laf A	MKQFNYSHKDLAVVVGGRRNNWQTNVGGAVGGAVGSAMIGATVGGTICGPACAVAGAHYLPILWTGVTAAATGGFGKIRK	<i>L. jhonsonii</i>	Pridmore <i>et al.</i> , 2004
	Laf X	MKLNDKELSKIVGGNRWGDVLSAASGAGTGKACKSFGPWGMAICGVGGAAIGGYFGYTHN		
Plantaricine E/F	Pln E	MLQFEKLQYSRLPQKKLAKISGGFNRRGGYNFGKSVRHVVDAIGSVAGIRGILKSIR	<i>L. plantarum</i>	Shojaei 2009
	Pln F	MKKFLVLRDRELNASISGGVFHAYSARGVRNNYKSAVGPADWVISAVRGFHGG		
Plantaricine J/K	Pln J	MTVNMKIKDLDDVDAFAPISNNKLNQVGGGAWKNFWSLRKGFYDGEAGRAIRR	<i>L. plantarum</i>	Diep <i>et al.</i> , 1995
	Pln K	MKIKLTVLNEFEELTADAENISGGRRSRKNGIGYAIGYAFGAVERAVLGGSRDYNK		
Plantaricine NC8	PlnNC8 α	MNNLNKFTLKGSSLSQIEGGDLTTKLWSSWGYLGGKARWNLKHPYVQF	<i>L. plantarum</i>	Maldonado <i>et al.</i> , 2003
	PlnNC8 β	MDKFEKISTSNLEKISGGSVPTSVYTLGKILWSAYKHKRTIEKSFNKGFYH		
Plantaricine S	Pls α	MNNALSFEQQFTDFSTLSDSELEVEGGRNKLAYNMGHYAGKATIFGLAAWALLA	<i>L. plantarum</i>	Stephens <i>et al.</i> , 1998
	Pls β	MDKIKFGGISDDQLNAVIGGKQSWYAAAGDAIVSFGEGFLNAW		
Salivarinicine P	Sln 1	KRGPNCVGNFLGGLFAGAAAAGVPLGPAGIVGGANLGMVGGALTCL	<i>L. salivarius</i>	Barrett <i>et al.</i> , 2007
	Sln 2	KNGYGGSGNRVWHCGAGIVGGALIGAIGGPWSAVAGGISGGFASCH		
ABP-118	Abp118 α	MMKEFTVLTECELAKVDDGGKRGPNVGNFLGGLFAGAAAAGVPLGPAGIVGGANLGMVGGALTCL	<i>L. salivarius</i>	Flynn <i>et al.</i> , 2002
	Abp118 β	MKNLDRFTIMTEDNLASVNGGKNGYGGSGNRVWHCGAGIVGGALIGAIGGPWSAVAGGISGGFTSCR		
Entéroccine 1071	Ent1071A	MKQYKVLNEKEMKKPIGG ESVFSKIGNAVGPAAYWILKGLGNMSDVNQADRINRKKH	<i>E. faecalis</i>	Balla <i>et al.</i> , 2000
	Ent1071B	MKNIKNASNIKVIEDNELKAITGGGPGKWLPLWLPAYDFVTGLAKGIGKEGNKKNKWKNV		
Entéroccine C	Ent C1	MKQYKVLNEKEMKKPIGG ESVFSKIGNAVGPAAYWILKGLGNMSDVNQADRINRKKH	<i>E. faecalis</i>	Maldonado <i>et al.</i> , 2009
	Ent C2	MKNIKNASNIKVIEDNELKAITGG GPGKWLPLWLPAYDFVAGLAKGIGKEGNKKNKWKNV		
Mutacine IV	Nlm A	KVSGGEAVAAIGICATASAAIGGLAGATLVTPYCVGTWGLIRSH	<i>S. mutans</i>	Qi <i>et al.</i> , 2001
	Nlm B	DKQAADTFLSAVGGAAASGFTYCASNGVWHPYILAGCAGVGA VGSVVPFH		
Thermophiline 13	Thm A	AYSGKDCLKDMGGYALAGAGSGALWGAPAGGVGALPGA FVGAHVGA IAGGFACMGMIGNKFN	<i>S. thermophilus</i>	Marciset <i>et al.</i> , 1997
	Thm B	QINWGSVVHCIGGAIIGGAFSGGAAAGVGLVGS GKA IINGL		
Brochocine C	Brc A	MHKVKKLNNQELQQIVGGYSSKDKLDIGKIGAGTVAGAAGGGLAAGLGAIPGAFVGAHFGVIGGSAACIGLLGN	<i>Brochothrix campestris</i>	McCormick <i>et al.</i> , 1998
	Brc B	MKKELLKNEMSRIIGG KINWGNVGGSCVGGAVIGGALGGLGGAGGGCITGAIGSIWDQW		

c. La sous-classe IIc

La sous classe IIc a été dédiée aux bactériocines dont les extrémités N- et C-terminales sont reliées de manière covalente (Nes *et al.*, 2007). L'entéroisine AS-48 produite par *E. faecalis* ssp. *liquefaciens* est la plus étudiée de ce groupe (Diep *et al.*, 1995; Bastos *et al.*, 2009). Une recherche génétique par PCR indique que les gènes codant pour cette bactériocine sont abondants chez les entérocoques (Joosten *et al.*, 1997). Cette bactériocine agit non seulement sur un grand nombre des bactéries à Gram positif mais également sur certaines bactéries à Gram négatif (Galvez *et al.*, 1989).

d. La sous-classe IId

Les bactériocines restantes, linéaires et non pédiocine-like sont regroupées dans la sous classe IId. Dans certains cas, cette dernière a été subdivisée sur la base de la séquence *leader*. Certains peptides antimicrobiens sont synthétisés sans une séquence N-terminale d'où leur nom « *leaderless bacteriocins* ». Ils sont initialement identifiés chez *Streptococcus* et *Staphylococcus* (Watson *et al.*, 1988; Donvito *et al.*, 1997) en tant que peptides hémolytiques. Mais ils possèdent également une activité bactéricide comme c'est le cas de la cytolysine, l'antibiotique produit par *E. faecalis* (Brock & Davie, 1963). Ces bactériocines ont été décrites chez différentes espèces de bactéries à Gram positif, telles que *S. aureus*, *E. faecium* et *Lc. lactis* (Tableau 4) (Nes *et al.*, 2007). C'est le cas par exemple des entéroisines 7A et 7B, qui ont été récemment isolées d'*E. faecalis* 710C (Lohans *et al.*, 2013). Leurs structures tridimensionnelles ont été les premières à être décrites dans cette sous-classe (Lohans *et al.*, 2013).

Tableau 4. Exemples de bactériocines de la sous-classe IId "*leaderless bacteriocins*"

Bactériocine	Producteur	Nombre de résidus d'acides aminés	Référence
Aureocin A53	<i>S. aureus</i>	51	Fimland <i>et al.</i> , 1996
Aureocin A70	<i>S. aureus</i>	AurA : 31 Aur A : 30 Aur C : 31 Aur D : 31	Netz <i>et al.</i> , 2001
Enterocin L50	<i>E. faecium</i>	L50A : 43 L50B : 42	Cintas <i>et al.</i> , 1998 Florianio <i>et al.</i> , 1998
Enterocin Q	<i>E. faecium</i>	34	Siezen <i>et al.</i> , 1996
Lacticin Q	<i>L. lactis</i>	53	Fujita <i>et al.</i> , 2007
LsbB	<i>Lc. lactis</i>	30	Gajic <i>et al.</i> , 2003
Enterocin	<i>E. faecalis</i>	44	Yamamoto <i>et al.</i> , 2003
EJ97Enterocin RJ-11	<i>E. faecalis</i>	44	Sánchez-Hidalgo <i>et al.</i> , 2003

e. La sous-classe IIe

Chez les eucaryotes, différentes histones (Richards *et al.*, 2001; Birkemo *et al.*, 2003), ainsi qu la lactoferrine (Gifford *et al.*, 2005) sont des sources de peptides antimicrobiens de la sous-classe IIe. Ce type de bactériocines comporte les peptides antimicrobiens produits par une dégradation spécifique de grandes protéines (Nes *et al.*, 2007). La bactériocine propionicine F (43 résidus d'acides aminés), provenant de la dégradation d'une grande protéine (PcfA, constituée de 255 résidus d'acides aminés) de *Propionibacterium freudenreichii* est l'une des bactériocines les mieux étudiées de cette sous-classe (Brede *et al.*, 2004). Elle est hydrophobe avec une charge nette négative (Brede *et al.*, 2004).

3. Biosynthèse des bactériocines et régulation

Les gènes associés à la biosynthèse des bactériocines sont regroupés en opérons. Ils sont souvent associés à des éléments transférables tels que des transposons et des plasmides. Toutefois, plusieurs bactériocines ont des systèmes de production situés sur des chromosomes, c'est le cas par exemple de l'helvéticine J (Joerger & Klaenhammer, 1986) de l'entéroïne A, de la divercine V41, de la sakacine P, de la carnobactériocine B2, de la carnobactériocine BM1 et de la nisine (figure 8) (Aymerich *et al.*, 1996). Les gènes impliqués dans la biosynthèse de la nisine (Steen *et al.*, 1991) sont, quant à eux, intégrés sur le chromosome à partir d'un plasmide par l'intermédiaire de transposons (Dodd *et al.*, 1990; Hom *et al.*, 1991; Cui *et al.*, 2012).

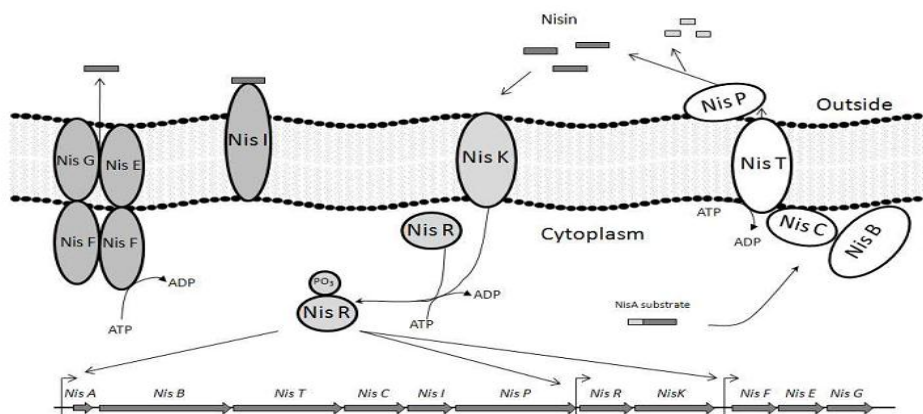


Figure 8. Régulation de la production, modification post-traductionnelles et auto-immunité de la nisine (Patton & Van Der Donk, 2005). « NisA substrate » est le pré-peptide non biologiquement actif qui sera déshydraté par NisB et cyclisé par NisC avant sa translocation par l'ABC transporteur NisT et le clivage de la séquence signal par la protéase NisP. Ces modifications conduiront au peptide biologiquement actif. La nisine interagira avec l'histidine kinase NisK, ce qui induira la phosphorylation du régulateur de réponse NisR et l'activation de la transcription des gènes nécessaires à la production de la nisine. La protection de la cellule vis à vis de la nisine est réalisée par deux mécanismes : la lipoprotéine d'immunité NisI et l'ABC transporteur formé par NisG, NisE et NisF.

En général, les gènes impliqués dans les différentes biosynthèses sont situés à proximité les uns des autres. Ils codent pour les protéines suivantes (Simon & Gorbach, 1987):

- protéines d'induction, celles qui reçoivent un signal de l'inducteur (externe à la cellule) et provoquent la transcription des gènes codant pour la biosynthèse de la bactériocine ;
- la bactériocine, synthétisée sous une forme inactive nécessitant une maturation. La bactériocine est synthétisée en même temps que sa protéine d'immunité, permettant à la cellule productrice de résister à sa propre bactériocine ;
- protéines de transport de la bactériocine à l'extérieur de la cellule ;
- protéines de maturation, permettant le clivage d'un prépeptide inactif de la bactériocine ou alors des modifications post-traductionnelles dans le cas des lantibiotiques;

Les opérons des lantibiotiques incluent un ou plusieurs cadres ouverts de lecture (ORFs) impliqués dans les modifications des acides aminés du peptide immature. L'ordre dans lequel se présentent les différents gènes n'est pas le même d'une bactériocine à une autre, comme le démontre la figure 10. Il arrive également qu'une souche ne possède qu'une partie des gènes essentiels à l'expression d'une bactériocine et ne la produit pas. C'est le cas notamment, de la souche de *L. lactis* IL1403 qui possède les gènes d'exportation de la lactococcine A mais ne produit naturellement aucune bactériocine (Venema *et al.*, 1996).

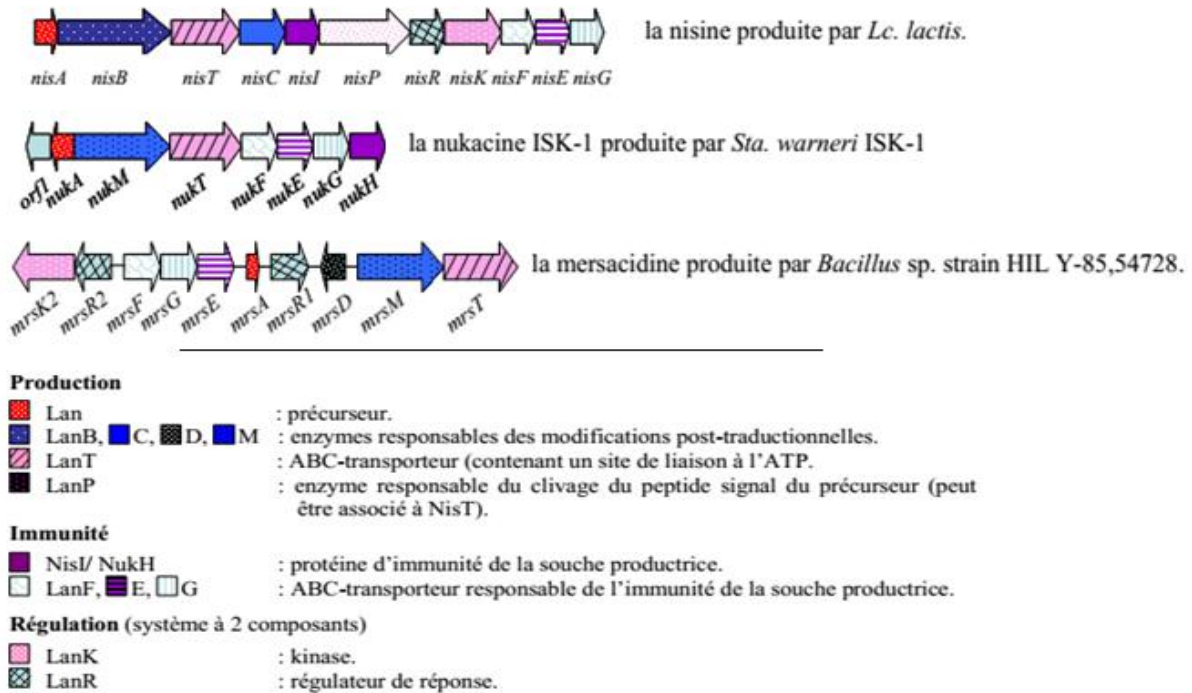


Figure 9. Organisation des clusters des gènes impliqués dans la biosynthèse de certains lantibiotiques.

Les facteurs d'induction, qui sont inconnus pour la plupart des bactériocines, provoquent un signal chez une histidine-kinase située à la surface de la membrane. Celle-ci induit la phosphorylation d'un régulateur de réponse qui interagit directement avec les différents promoteurs présents sur l'opéron de la bactériocine. Ainsi, comme le montre la figure 10, suite à l'induction, les bactériocines de la classe IIa sont synthétisées par voie ribosomique sous forme de pré-peptides (pré-bactériocine). Pour la nisine et la carnobacteriocine 82, l'inducteur est la bactériocine elle-même, qui provoque sa propre production (Kuipers *et al.*, 1995; Quadri *et al.*, 1997).

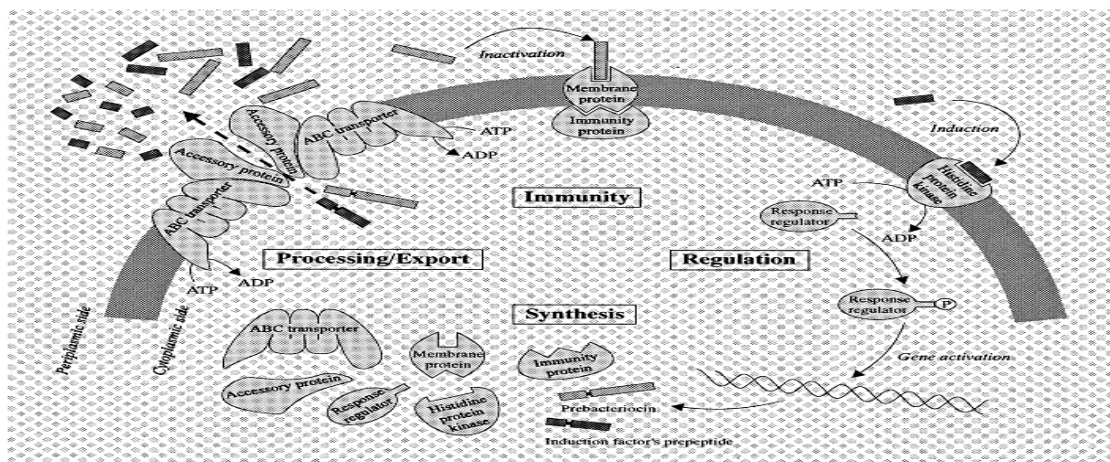


Figure 10. Aperçu schématique du mécanisme proposé pour la production de bactériocines de la classe IIa (Ennahar *et al.*, 2000)

Les bactériocines sont généralement synthétisées sous forme de pré-peptides inactifs, comprenant une séquence leader N-terminale. Cette dernière permet à la bactériocine de rester inactive dans la cellule productrice, facilite l'interaction avec le transporteur et joue vraisemblablement un rôle dans la reconnaissance par le mécanisme de modification dans le cas des lantibiotiques (Zacharof & Lovittb, 2012). La séquence *leader* est habituellement éliminée lors de l'exportation par le système de transport de bactériocines, soit de type transporteur *ABC* (ATP Binding Cassette), soit, moins fréquemment, par la voie de sécrétion générale (*Sec*) de la cellule (Cotter *et al.*, 2005; Zacharof & Lovittb, 2012) afin de libérer la bactériocines matures (figure 11) (Havarstein *et al.*, 1995; Ennahar *et al.*, 2000).

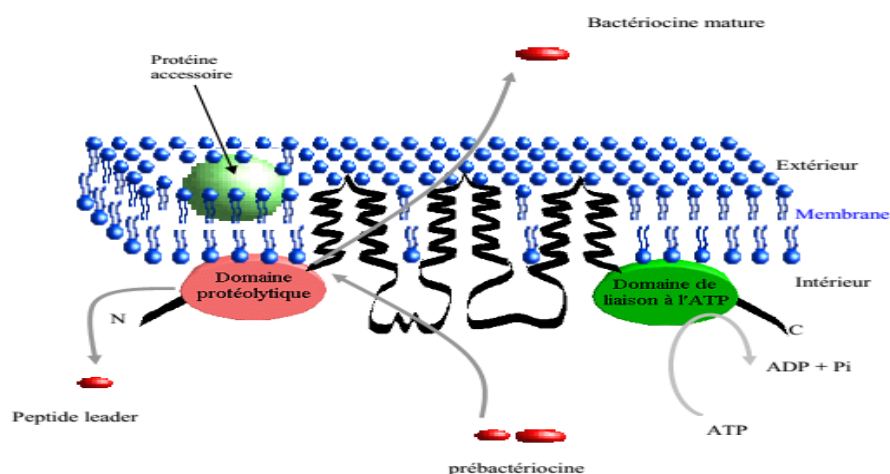


Figure 11. Mécanisme de transport et de maturation des pré-bactériocines de la sous-classe IIa possédant un peptide leader (Simon, 2001)

La plupart des pré-bactériocines de classe II et certains pré-lantibiotiques possèdent une séquence *leader* N-terminal de type «double-glycine» (tableau 5), relativement conservée pour certains ce qui suggère que les transporteurs *ABC* et les protéines associées correspondantes sont également similaires (Ennahar *et al.*, 2000).

Tableau 5. Alignement des séquences des peptides leaders des bactériocines de la sous-classe IIa sur la base du motif double glycine C-terminal (Ennahar *et al.*, 2000).

Bactériocine	Peptide Leader
Sakacin/curvacin A	MNNVKELSMTELTITGG
Carnobacteriocin BM1	MKSVKELNKKEMQQIIGG
Carnobacteriocin B2	MNSVKELNVKEMKQLHGG
Sakacin P	MEKFIELSLKEVTAITGG
Enterocin A	MKHLKILSIKETQLIYGG
Pediocin AcH/PA-1	MKKIEKLTEKEMANIIGG
Acidocin A	MISMISSHQTLTDKELALISGG
Divercin V41	MKNLKEGSYTAVNTDELKSINGG
Leucocin A	MMNMKPTESYQLDNSALEQVVGG
Mesentericin Y105	MTNMKSVEAYQQLDNQNLKVVGG

4. Mécanismes d'action

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques, agissent en général par le même mécanisme d'action, en perturbant le fonctionnement de la membrane cytoplasmique (Nes *et al.*, 2007). C'est le mode d'action le plus répandu, surtout chez les bactériocines de la classe II. La première étape est une interaction initiale de la bactériocine avec des récepteurs cellulaires spécifiques (reconnaissance d'une cible), c'est le cas notamment de la mersacidine (Brotz *et al.*, 1998) et de la nisine (Van de Venet *et al.*, 1991) ou non spécifiques (interactions électrostatiques ou hydrophobes) (Brogden, 2005).

Les bactériocines vont par la suite s'adsorber sur la membrane cytoplasmique et la perméabiliser par formation de pores conduisant à la mort de la cellule cible (Ecker, 1992; Ennahar *et al.*, 2000; Peschel, 2002; Brogden, 2005). Ainsi, l'action de la bactériocine se traduit, d'une part par l'augmentation de la perméabilité membranaire, provoquant un déséquilibre ionique et une fuite de phosphate inorganique (Klaenhammer, 1993; Cenatiempo *et al.*, 1996; Ennahar *et al.*, 2000) et d'autre part par une perte de la Force Proton Motrice (FPM) qui implique la dissipation totale du potentiel transmembranaire et du gradient de pH (Nicholls & Ferguson, 1992; Montville & Chen, 1998; Ennahar *et al.*, 2000). Cette FPM joue un rôle central dans la synthèse de l'ATP, le transport actif et la mobilité bactérienne (Nicholls & Ferguson, 1992).

D'autres bactériocines ont un autre mode d'action : la perturbation du fonctionnement de la cellule. Koo *et al.* (2001) ont montré que la perméabilisation seule de la membrane de *S. aureus* par la gramicidine D et la protamine ne conduisait pas à la mort de la cellule. Différentes cibles peuvent être attaquées, ce qui contribue à perturber le fonctionnement cellulaire. L'épidermine, la mersacidine, ainsi que la nisine (Brotz *et al.*, 1998) se lient au lipide II et inhibent la transglycosylation, étape clé de la biosynthèse de la paroi bactérienne (Brotz *et al.*, 1998). D'autres peptides antimicrobiens peuvent inhiber la synthèse des acides nucléiques, comme la pleurocidine et la dermaseptine S1 (Patrzykat *et al.*, 2002), ou inhiber la synthèse protéique ou encore inhiber certaines fonctions enzymatiques (Brogden, 2005).

5. Auto-immunité

Les souches productrices de bactériocines sont protégées contre l'action de leurs propres bactériocines (Chatterjee *et al.*, 2005; Zacharof & Lovittb, 2012). Elles s'en prémunissent à l'aide d'une protéine « d'immunité » (Abee *et al.*, 1995; Johnsen *et al.*, 2004). Cette dernière est généralement spécifique à chaque souche productrice, mais peut dans

certains cas protéger la souche productrice contre des bactériocines proches de sa propre bactériocine (Fimland *et al.*, 2002; Johnsen *et al.*, 2004). Ceci suggère une relation entre deux notions distinctes : la résistance à la bactériocine et l'immunité (Ennahar *et al.*, 2000). Le gène codant pour la production des protéines immunitaires est la plupart du temps co-transcrit avec le gène de structure de la bactériocine, les deux gènes faisant partie du même opéron (Fimland *et al.*, 2002).

Chez les lantibiotiques, deux mécanismes peuvent être responsables de l'auto-immunité, d'une part, une lipoprotéine d'immunité est produite, celle-ci est codée par le gène *LanI* et s'attache à la surface externe de la membrane et interagit avec le lantibiotique afin d'empêcher la formation de pores dans la membrane de la cellule productrice (McAuliffe *et al.*, 2001; Twomey *et al.*, 2002). D'autre part, le transporteur ABC, codé par les gènes *LanE*, *LanF* et *LanG*, permet l'exportation des lantibiotiques à l'extérieur de la membrane cellulaire et le maintien de la concentration intracellulaire en dessous du seuil critique (Zacharof & Lovittb, 2012). Ce mode d'action doit être complété par le premier pour assurer une immunité suffisante au producteur (McAuliffe *et al.*, 2001; Twomey *et al.*, 2002; Stein *et al.*, 2003; Li & O'Sullivan, 2006). De grandes différences entre les séquences des protéines d'immunité ont été observées malgré le haut degré d'homologie des bactériocines correspondantes (Aymerich *et al.*, 1996; Eijsink *et al.*, 1998; Fimland *et al.*, 2002). A l'inverse, une forte similarité entre ces protéines ne signifie pas une similarité entre les bactériocines correspondantes (Ennahar *et al.*, 2000). De plus, malgré le faible degré de similitude entre les séquences des protéines d'immunité, des ressemblances dans leurs structures secondaires et tertiaires ont été observées (Ennahar *et al.*, 2000).

6. Résistance

Les phénomènes de résistance des souches sensibles peuvent exister naturellement ou résulter d'une exposition répétée aux bactériocines. Les mécanismes de résistance des bactéries sont très variés. Ils impliquent des changements structuraux et physiologiques de la cellule bactérienne (Galvin *et al.*, 1999; Guangshun *et al.*, 2015). Ils peuvent être de deux ordres : le premier mécanisme consiste en une diminution de la perméabilité cellulaire suite à une modification de la structure de la membrane, les constituants lipidiques de la membrane jouant un rôle plus ou moins direct dans la fixation des bactériocines sur à la surface membranaire (Mazzotta *et al.*, 1997). La résistance de *L. monocytogenes* à la nisine a ainsi été attribuée à des changements de la composition en acides gras membranaires et à des

modifications au niveau de la paroi, mais aucune modification au niveau du lipide II n'a été détectée (Kramer *et al.*, 2006; Naghmouchi *et al.*, 2007). Le second mécanisme de développement de résistance est l'inactivation de la molécule active par modification chimique ou dégradation protéolytique du peptide antimicrobien (Kraus & Peschel, 2006). Ainsi, la nisinase, produite par certaines souches bactériennes inactives la nisine (Klaenhammer, 1993).

Des résistances croisées contre des bactériocines de classes différentes sont aussi possibles, la résistance de *L. monocytogenes* acquise à la nisine A ou Z (classe I) augmente sa résistance à la pédiocine PA-1 et à la divergicine M35, deux bactériocines de classe IIa (Naghmouchi *et al.*, 2007).

7. Applications et intérêts

7.1. Domaines d'applications

a. Applications alimentaires

Plusieurs travaux ont permis de montrer l'efficacité des bactériocines ou de souches productrices de bactériocines dans différentes matrices alimentaires. En 1998a, Ennahar *et al.*, ont montré que *L. monocytogenes*, présente dans le fromage Munster, était inhibée par l'addition de *L. plantarum* WHE 92, une souche productrice de pédiocine PA-1. La même souche de *L. monocytogenes* a également été inhibée par l'enterocine 81 produite par *E. faecium* WHE 81 (1998b). Izquierdo *et al.*, (2009), en utilisant cette même souche d'*Enterococcus faecium* WHE 81, comme culture de surface au début de la maturation du fromage Munster ont également empêché le développement de *L. monocytogenes*. De même, il a été démontré que la pédiocine PA-1 incorporée dans un film d'emballage permet de réduire significativement la charge initiale de *Listeria monocytogenes* sur la surface de la viande (Woraprayote *et al.*, 2013).

De leur côté, Ananou *et al.*, (2010) (Ananou *et al.*, 2010), en additionnant l'entérocin AS-48 sous forme lyophilisée à du lait écrémé, ont pu inhiber la prolifération de *L. monocytogenes* et réduire progressivement la population de *S. aureus*. Récemment, Martinez *et al.* (2015) ont montré l'inhibition de la croissance de deux souches de *L. monocytogenes* (4b et ½ a) dans un fromage à tartiner en utilisant la souche *L. sakei* ssp. *sakei* 2a, présentant une bonne capacité bactériocinogénique et probiotique ainsi d'une adaptation à la matrice laitière testée. Cette même souche, encapsulée dans des nano-vésicules liposomiques et

introduite dans du lait de chèvre a retardé la croissance de *L. monocytogene* pendant plusieurs jours (Malheiros *et al.*, 2016). De leur côté, Casburi *et al.*, (2016), en utilisant la souche *L. curvatus* 54M16, une souche multi-productrice de bactériocines (les sakacines X, T et P), ont montré une activité inhibitrice permettant l'amélioration de la qualité sanitaire de saucisses fermentées traditionnels. En effet, ces trois sakacines ont permis l'inhibition des souches pathogènes testées telles que *L. monocytogenes* et *Bacillus cereus*. Cependant, aucune bactérie à Gram négatif n'a montré de sensibilité à ces bactériocines.

L'utilisation de la technologie des barrières *Hurdle Technology* qui consiste en une combinaison de bactériocines avec d'autres méthodes de conservation des aliments a donné des résultats prometteurs (Milles *et al.*, 2011). En effet, cette technologie permet de minimiser le développement des souches résistantes, dans la mesure où les peptides antimicrobiens ont un effet additif ou synergique lorsqu'ils sont utilisés conjointement avec des traitements physiques par exemple (Galvez *et al.*, 2008 ; Mills *et al.*, 2011). Ainsi, un traitement à haute pression hydrostatique combiné à l'utilisation de bactériocines a montré d'importants dommages de la membrane cytoplasmique de la population microbienne cible (Galvez *et al.*, 2007). En outre, les bactériocines ont une plus grande possibilité de cibler les agents pathogènes à Gram négatif en présence des agents chélatants. Ainsi, l'application de la nisine avec de l'EDTA a inhibé efficacement *E.coli*, *Salmonella spp* et *L. monocytogenes* (Ukuku *et al.*, 2009). Plusieurs autres travaux des applications alimentaires des bactériocines combinées à d'autres barrières chimiques ont été réussis, telles que : la nisine Z combinée au thymol pour inhiber *L. monacytogenes* (Ettayebi *et al.*, 2000), l'enterocine AS-48 combinée avec de NaCl pour inhiber *S. aureus* (Ananou *et al.*, 2004).

b. Applications médicales

En 2014, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a estimé que 25 000 décès annuels en Europe sont attribués à l'émergence progressive de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques (Tattevin *et al.*, 2014). Compte tenu de l'importance de ce problème, les recherches s'intensifient en direction de substances dotées d'activités antibactériennes capables d'aider à la lutte contre les souches multi-résistantes. A ce titre, les bactériocines produites par les bactéries lactiques semblent être des molécules de choix (Nettles & Barefoot, 1993). Leur activité antimicrobienne importante *in vitro* et *in vivo*, la variété de spectres d'activité qu'elles offrent, leur faible toxicité, et la capacité de certains probiotiques à en produire *in vivo* chez l'Homme font que les peptides antimicrobiens peuvent constituer une

alternative aux antibiotiques (Cotter *et al.*, 2013). Ainsi, des tests *in vivo* effectués chez des chiens ont montré l'inhibition par la nisine de biofilms de *Staphylococcus* ou de *Streptococcus* responsables des infections de plaques dentaires et des gingivites (Howell *et al.*, 1993; Tattevin *et al.*, 2014).

Les souches de *staphylococcus aureus* multi-résistantes à la méthicilline (SARM) constituent depuis longtemps un problème majeur, en raison d'infections nosocomiales cutanées (Taylor *et al.*, 1992). Or, plusieurs bactériocines ont montré des effets bactéricides contre ces SARM, notamment, la lacticine 3147 (Galvin *et al.*, 1999) et la mersacidine (Sass *et al.*, 2008). Il s'agit là d'une voie de recherche prometteuse, bien qu'une récente étude ait démontré que les staphylocoques ont pu développer des mécanismes de résistance pour échapper à l'activité bactéricide de ces peptides antimicrobiens (Joo & Otto, 2015). Une autre étude a permis de prévenir le développement de *listériose* chez des patients à risque, par l'administration d'un probiotique, *L. salivarius* UCC118, produisant la bactériocine UCC118 de classe IIb (Cotter *et al.*, 2013).

7.2. Etat des lieux des utilisations

Les bactériocines peuvent être incorporées directement dans les aliments selon différentes formulations : une préparation de bactériocines sous forme purifiée ou semi-purifiée lyophilisée, comme par exemple les produits commerciaux Nisaplin (Danisco, France) et Chrisin (Christen Hansen, Danemark) (Guinane *et al.*, 2005) (Schillinger *et al.*, 1996; Stiles, 1996; Cotter *et al.*, 2005) ; ou alors un concentré obtenu après fermentation par la souche productrice comme c'est le cas de la pédiocine PA-1. Il s'agit d'une bactériocine de sous-classe IIa produite par une souche de *P. acidilactici* (Rodriguez *et al.*, 2002) et commercialisée sous le nom d'Alta 2341 (Deegan *et al.*, 2006; Milles *et al.*, 2011). Son utilisation est couverte par plusieurs brevets américains et européens (Ennahar *et al.*, 2000; Rodriguez *et al.*, 2002). Les bactériocines peuvent également être incorporées indirectement en appliquant la souche productrice dans le produit alimentaire (production *in situ*), en substituant tout ou une partie du ferment (Cotter *et al.*, 2005), c'est l'approche la plus utilisée (Perez *et al.*, 2014). Cette application avec production *in situ* offre plus d'avantages par rapport à une utilisation *ex situ* de par son efficacité et son faible coût (Ross *et al.*, 2000; Leroy *et al.*, 2006).

Les bactéries lactiques jouissent du statut GRAS par la Food and Drug Administration (FDA), leur utilisation en tant que ferments et producteurs de bactériocines est ainsi très

répandue, étant donnée qu'elle ne nécessite pas l'obtention d'une autorisation réglementaire particulière (Montville & Winkowski, 1997). Les conditions de croissance de la souche productrice, l'action de la bactériocine produite contre les bactéries indésirables, ainsi que les effets éventuels sur les ferments utilisés sont les principales caractéristiques à prendre en considération lors de la sélection de souches productrices de bactériocines pour des applications dans l'industrie alimentaire (Muñoz *et al.*, 2007).

L'utilisation des cellules immobilisées dans des billes d'alginate permet d'améliorer la survie des bactéries productrices et la stabilité des bactériocines produites (Gbassi *et al.*, 2009; Barbosa *et al.*, 2015; Narsaiah *et al.*, 2015). Ces microsomes, contenant la bactérie productrice, sont de minuscules réservoirs qui assurent la libération progressive de la bactériocine tout en la protégeant des protéases et des inactivations dues aux interactions avec les aliments (Mauriello *et al.*, 2004). Enfin, un autre moyen de diffusion est l'enrobage de la surface des emballages alimentaires par des bactériocines (Kim *et al.*, 2002; Galvez *et al.*, 2007; Woraprayote *et al.*, 2013).

7.3. Contraintes d'utilisation et de mise sur le marché

Les bactériocines présentent ainsi un potentiel non négligeable aussi bien pour les industries agro-alimentaires que pour celles de la santé. Cependant, leurs applications se heurtent encore à certaines difficultés techniques, notamment, la composition et les propriétés physico-chimiques de l'aliment. En effet, la structure des bactériocines et leur activité sont sensibles à des changements de pH, à l'adsorption sur les constituants de la matrice alimentaires ou encore aux traitements physiques de l'aliment, notamment le chauffage (Devlieghere *et al.*, 2004 ; Galvez *et al.*, 2007; Dortu & Thonart, 2009). Ainsi, la nisine perd son activité au-dessus d'un pH 7 (Deegan *et al.*, 2006). D'autre part, les bactéries cibles peuvent former des biofilms sur des matrices alimentaires solides, ce qui les rend plus résistantes aux bactériocines (Schöbitz *et al.*, 2003; Dortu & Thonart, 2009). Enfin, une autre contrainte réside dans l'absence d'une réglementation commune pour l'application des bactériocines et la difficulté d'obtenir une autorisation pour les applications industrielles (Freire, 2010). La nisine a été commercialisée pour la première fois en Angleterre en 1953, puis incluse en 1983 dans la liste européenne des additifs alimentaires sous le numéro E234 (European Economic Community, 1983; Milles *et al.*, 2011). C'est à ce jour, la seule bactériocine légalement commercialisée comme conservateur alimentaire (Cotter *et al.*, 2005; De Arauza *et al.*, 2009).

Pour les applications médicales des bactériocines, aucune autorisation de leur mise sur le marché en tant que médicament n'a encore été obtenue, en raison de plusieurs contraintes (Tattevin *et al.*, 2014). En effet, les peptides antimicrobiens sont rapidement dégradés par les protéases du tube digestif, leur administration par voie orale risque donc d'être inefficace. Nair & Laurencin (2007) ont proposé la formulation de bactériocines entourée d'un film polymérique sous forme de nanoparticules afin de contourner ce problème.

III. Risques alimentaires liés à *Listeria monocytogenes*

1. pathogènes alimentaires

Les aliments de consommation humaine sont rarement stériles. Ils contiennent des microorganismes bénéfiques appelés flore microbienne endogène. Cette dernière joue un rôle dans le développement de l'arôme, de la texture, ainsi que dans l'acidification et la conservation des aliments dans lesquels ils se développent (Zuliani & Garry, 2004). Cependant, l'existence d'autres microorganismes indésirables sur le plan hygiénique et organoleptique est possible. On distingue d'une part, les microorganismes d'altération, responsables des dégradations organoleptiques ou nutritionnelles et par conséquent de la diminution de la durée de vie des aliments. D'autre part, les microorganismes pathogènes, qui prolifèrent et libèrent des toxines, provoquent des toxi-infections alimentaires ou TIAC (Zuliani & Garry, 2004). Les principaux germes pathogènes responsables de ces TIAC sont: *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Campylobacter* sp, *Salmonella* sp, *S. aureus*, *Vibrio cholerae*, *Shigella* sp, *Yersinia* sp, *E. coli* et *L. monocytogenes* (Zuliani & Garry, 2004; Rev Toxicol Maroc N° 6 - 3ème trimestre, 2010).

Parmi les microorganismes pathogènes pouvant contaminer les aliments et par conséquent être à l'origine de pathologies graves, on va mettre l'accent sur *L. monocytogenes*. La porte d'entrée est digestive (aliments contaminés), néanmoins, un contact étroit avec les animaux peut être aussi une source de transmission directe de *Listeria* (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007).

2. *Listeria monocytogenes* et les TIAC

En raison de son caractère ubiquitaire, *L. monocytogenes* peut être considérée comme un agent pathogène alimentaire « parfait » (Brisabois *et al.*, 1997). Elle est responsable de la listériose, maladie infectieuse touchant essentiellement des personnes à risque tels que les

femmes enceintes et leurs nouveau-nés, les personnes âgées et les personnes dont le système immunitaire est fragilisé (Farber & Peterkin, 1991; Goulet & Marchetti, 1996). Cependant, elle peut aussi, dans certains cas, toucher des individus sans aucun facteur de risque identifié (Goulet & Marchetti, 1996; Goulet *et al.*, 2004). La listériose se manifeste sous plusieurs formes invasives (les bactériémies, les formes neuro-méningées et les formes materno-néonatales) (Tourdjman *et al.*, 2014).

L. monocytogenes peut contaminer les grandes catégories d'aliments (lait et produits laitiers, viande crue et produits carnés, produits végétaux ou produits de la mer) (Berche *et al.*, 2000). La Commission européenne, a établi un plan de surveillance communautaire harmonisé ou *Baseline Survey* afin de recueillir des données de prévalence comparables entre les États membres (Goulet *et al.*, 2006).

En France, 300 cas en moyenne de listériose sont diagnostiqués chaque année. Ils correspondent à une incidence annuelle de 0,4 cas pour 100000 habitants (Roussel *et al.*, 2013). Un dispositif de surveillance continu des cas de listériose et de surveillance de *L. monocytogenes* dans les aliments a été mis en place afin de prévenir et de réduire le nombre de cas d'infections (Goulet *et al.*, 2006).

Au Maghreb, son incidence réelle est controversée. Seuls quelques cas sporadiques ont été rapportés (Tari, 1981; Boukadida *et al.*, 1994), dont cinq cas de listériose néonatale diagnostiqués à l'hôpital des Enfants de Casablanca entre janvier 1990 et décembre 1998 (Ben Omar *et al.*, 2000). En fait, c'est le manque de moyens de diagnostic et de systèmes de surveillance appropriés qui constituent les principales raisons derrière la faible détection des cas de la listériose dans les pays en développement, dont le Maroc.

3. Qualité hygiéniques des produits laitiers fermentés traditionnels marocains

La sécurité sanitaire des produits fermentés traditionnels, comme celle des produits industriels, est devenue l'une des préoccupations majeure des consommateurs. Pour réduire l'incidence des TIAC, la maîtrise de l'hygiène au cours de la production, du stockage et de la distribution des produits doit être assurée.

Malheureusement, la production traditionnelle n'est pas contrôlée et n'est pas bien réglementée. La majorité des producteurs et des distributeurs ne sont pas suffisamment informés des mesures d'hygiène à respecter et des procédures de maîtrise du risque. Une étude récapitulative sur 29 ans portant sur les cas de TIAC collectés par le Centre Anti Poison

du Maroc a montré que les premiers produits incriminés sont les produits laitiers. Ils sont à l'origine de 26,4 % des cas notifiés, le poisson et les produits de la pêche représentent 20,3 % des cas, les viandes et produits carnés 18,2 % des cas et le reste des aliments 35,1 % des cas. Dans la catégorie des produits laitiers, le lait fermenté (Lben) représentait 51,2 %. La létalité pendant la durée de l'étude était faible, 0,4 % dont 22,2% due à des contaminations de Lben (Rev Toxicol Maroc N° 6 - 3ème trimestre, 2010). Une étude réalisée sur l'évaluation microbiologique de produits laitiers traditionnels marocains (Lben, Jben) et de laits crus collectés dans différentes laiteries traditionnelles de la ville de Fès a montré une qualité hygiénique non satisfaisante pour les trois type de produits analysés. Une moyenne de 89%, 69% et 50% de non-conformité a été détectée respectivement dans les échantillons de Lben, du lait cru et du Jben (El Marnissi *et al.*, 2013).

Par ailleurs, Le Lben semble être le premier produit à l'origine des TIAC (22% des cas) selon une étude portant sur les foyers de TIAC notifiées à l'Hôpital provincial de Kenitra au cours de la période 2007-2009 (Belomaria *et al.*, 2010). Cette prévalence des TIAC liée au Lben peut être expliquée par le fait que c'est le produit traditionnel rafraîchissant le plus populaire et le plus consommé au Maroc. En outre, c'est un produit très périssable et sa préparation dans les laiteries traditionnelles marocaines se déroule généralement dans des conditions d'hygiène peut satisfaisantes.

CHAPITRE 2

Matériel et méthodes

I. Recherche et identification des bactéries productrices des bactériocines

L'objectif est d'isoler de nouvelles souches de bactéries lactiques à partir de différentes denrées alimentaires traditionnelles marocaines et françaises et de tester leur capacité à produire des **substances antimicrobiennes**. Les aliments choisis sont produits tous à bases de lait cru afin de multiplier les possibilités de sélectionner des souches sauvages productrices de nouvelles structures.

Cinquante échantillons de produits alimentaires d'origine animale ou végétale, issus de différentes zones géographiques et présentant une charge microbienne importante et diverse ont été analysés. Il s'agit de produits d'origine marocaine à savoir : lben (6 échantillons de différentes régions); jben (2); beurre (1); smen (1); lait cru de vache (1); olives noires et vertes (20); câpres (2); et poivron (1). Le reste des produits était constitué de fromages français: Munster au lait cru le petit Sapin (1); St. Nectaire fermier AOP (1); Brie de Meaux AOP Auchan (1); Ossau Iraty fermier AOP (1); Morbier bio Jean Perrin (1); Morbier au lait cru bio Auchan (1); Cantal AOP (2); Salers AOP (1); Gruyère bio AOP (1); Comté Fort des Rousses (1); Emmental Grand Cru (1); Reblochon de Savoie au lait cru de vache Pochat (1); Camembert au lait cru de vache Auchan (1);et Reblochon fruitier lait cru de vache Auchan (2). Les échantillons ont été prélevés et acheminés stérilement au laboratoire dans une glacière à 4°C et conservés temporairement au réfrigérateur jusqu'à leur analyse.

1. Isolements et purifications

Les échantillons collectés ont été mis en suspension puis dilués (produits solides) ou dilués directement (produits liquides) dans de l'eau physiologique (séries de dilutions décimales de 10^{-1} à 10^{-8}). Cent μ l de chaque dilution ont étéensemencés en surface sur différents milieux gélosés MRS, M17 et MSE (Biokar Diagnostics, Beauvais, France). Après 18 à 24h d'incubation à 34°C, les colonies ont subi le test indirect pour la mise en évidence de leurs activités antimicrobiennes. Les souches indicatrices sont repertoriées dans le tableau 6. Toutes les souches ont été cultivées dans le Bouillon cœur-cerveille (BHI) ou dans De Man, Rogosa et Sharpe (MRS) (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) pendant 18h à température optimale (30°C ou 37°C).

Tableau 6. Espèces cibles utilisées pour la mise en évidence et l'établissement du spectre d'activité antimicrobienne

Code	Espèce	Référence
B1	<i>B. cereus</i>	CIP 78.3
B2	<i>B. cereus</i>	LC 447
B3	<i>B. subtilis</i>	ATCC 6633
B4	<i>B. subtilis</i>	ATCC 9372
E2	<i>E. columbae</i>	F10d
E3	<i>E. faecalis</i>	G9h
E4	<i>E. faecalis</i>	G8b
E6	<i>E. faecalis</i>	CECT 481
E7	<i>E. faecalis</i>	CECT 795
E8	<i>E. faecalis</i>	WHE 96
E10	<i>E. faecium</i>	WHE 81
E11	<i>E. faecium</i>	LC 25
E12	<i>E. faecium</i>	DSM 10663
E13	<i>E. faecium</i>	HA
E14	<i>E. faecium</i>	OB
E16	<i>E. faecium</i>	JA
E18	<i>E. faecium</i>	IT62
E19	<i>E. faecium</i>	F1h
E20	<i>E. faecium</i>	B1BT/37
E21	<i>E. hirae</i>	CIP 5855
E22	<i>E. hirae</i>	LC 36
E23	<i>E. mundtii</i>	LC 362
E24	<i>E. pseudoavium</i>	C8VS
E25	<i>E. pseudoavium</i>	G3h
E26	<i>E. raffinosus</i>	LC 361
E27	<i>E. saccharolyticus</i>	ATCC 43076
E28	<i>E. sulfureus</i>	LC 361
E29	<i>E. coli</i>	ATCC 25922
K1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 10031
L1	<i>L. acidophilus</i>	LC 660
L3	<i>L. plantarum</i>	WHE 92
L4	<i>L. plantarum</i>	299v
L5	<i>L. plantarum</i>	ATCC 10241
L7	<i>L. plantarum</i>	CECT 4185
L9	<i>L. plantarum</i>	LC 56
L12	<i>L. plantarum</i>	LC 804
L13	<i>L. plantarum</i>	JB
L14	<i>L. plantarum</i>	MGC
L15	<i>L. sakeis ssp. Sakei</i>	ATCC 15521
L17	<i>L. lactis</i>	RO50
L18	<i>L. lactis</i>	WHE 53
L19	<i>L. lactis</i>	WHE 99
L20	<i>L. lactis</i>	WHE 102
L21	<i>L. lactis</i>	LC 61

L22	<i>L. lactis</i>	LC 72
L23	<i>L. lactis</i>	LC 73
L25	<i>L. lactis</i>	LC 406
L26	<i>L. lactis</i>	LC 452
L27	<i>L. lactis. ssp cremoris</i>	LC 657
L28	<i>L. lactis ssp. Lactis</i>	LC 54
L30	<i>L. innocua</i>	14 6a!
L31	<i>L. innocua</i>	6b
L33	<i>L. monocytogenes 1/2a</i>	1/2a
L34	<i>L. monocytogenes 1/2b</i>	1/2b
L35	<i>L. monocytogenes 1/2c</i>	1/2c
L36	<i>L. monocytogenes 3a</i>	3a
L37	<i>L. monocytogenes 3b</i>	3b
P1	<i>P. acidilactici</i>	
P3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027
S2	<i>S. typhimurium</i>	LC 443
S3	<i>S. marcescens</i>	LC 448
S4	<i>S. marcescens</i>	ATCC 13880
S5	<i>S. aureus</i>	ATCC 6538
S7	<i>S. epidermidis</i>	ATCC 12228
S8	<i>S. xylosum</i>	LC 57
S9	<i>S. pneumonia</i>	ATCC 6303

CIP : Collection de l'Institut Pasteur,
 ATCC : American Type Culture Collection
 CECT : Collection Espagnol de Culture Type,
 DSM : Collection allemande de microorganismes,
 LC : Collection du Laboratoire

2. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne

Le principe de la détection de l'activité antimicrobienne est basé sur la diffusion de l'agent antimicrobien dans des milieux de culture solides ou semi-solides pour inhiber la croissance des micro-organismes indicateurs sensibles. La mise en évidence de l'activité antimicrobienne est effectuée sur quelques souches représentant des espèces d'intérêt. Les souches révélant une activité inhibitrice sont purifiées par la méthode des stries (Guiraud, 1998) et sont testées par la suite par le test indirect dit des spots (Barry, 1980; Izquierdo *et al.*, 2009) pour confirmer l'activité antagoniste.

2.1. Test direct

Une culture jeune de la souche indicatrice est préparée : 5 ml de lactobacilli Agar AOAC ou bien de MRS agar sont liquéfiés à 100°C, refroidis à environ 50°C et inoculés à

0,1% avec une culture de la souche indicatrice en fin de phase exponentielle (environ 18h d'incubation) de façon à obtenir une concentration d'environ 10^5 UFC/ml. Les boîtes de Pétri contenant des colonies bien distinctes de la souche productrice (culture de la veille : 15-18h) sont recouvertes par cette suspension. Une fois l'agar solidifié, les boîtes sont incubées à 34°C pendant 18h. Une activité positive est détectée par la présence de zones d'inhibition autour des colonies, après examen des boîtes.

2.2. Test indirect

La méthode des spots utilisée consiste à inoculer un bouillon MRS par la souche productrice, l'incuber pendant 18 h à 34°C puis le filtrer (membrane de porosité 0,45µm). Un aliquote de 10 µl du filtrat est déposé sur une couche de gélose MRS, préalablement recouverte de 5 ml de la culture de la bactérie indicatrice préparée dans une gélose Lactobacilli Agar AOAC comme pour le test direct. Le test est refait 4 à 5 fois afin de confirmer le résultat. Un résultat positif est révélé par l'apparition d'une zone d'inhibition provoquée par le surnageant de la culture productrice.

2.3. Test de la dilution critique

Une série de dilutions critiques de 1/2 de la fraction à tester est préparée dans de l'eau ultra-pure stérile. Dix µl de chaque dilution sont déposés sur la boîte de Pétri préparée de la même façon que pour le test indirect. Les boîtes sont incubées à 34°C pendant 18h. L'inverse de la plus grande dilution inhibitrice multiplié par 100 représente l'activité antibactérienne en unités arbitraires par ml (UA / ml) (Ennahar *et al.*, 2001).

3. Identifications bactériennes

3.1. Par PCR

L'identification génotypique des souches dotées d'activité inhibitrice a été réalisée par l'amplification du gène de l'ARNr 16S selon la méthode décrite par Abriouel *et al.*, (2005). Cette identification a été effectuée au département sciences de la santé, Zone de microbiologie Campus Las Lagunillas, Espagne.

3.2. Par spectrométrie de masse

Les souches d'intérêt ont été identifiées au niveau de l'espèce par spectrométrie de masse à temps de vol par désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI-TOF MS) effectuée en utilisant un système Bruker Microflex LT, le logiciel Biotyper v. 3.0, et la base de données Bruker v. 01.03.66 (Bruker Daltonik, Brème, Allemagne), conformément aux instructions du fabricant. Cette identification a été réalisée au Laboratoire de bactériologie du Plateau Technique de Microbiologie des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg.

II. Purification et étude structurale des bactériocines

1. Purification des bactériocines

La purification des bactériocines produites a été effectuée en quatre étapes. Les protéines de la fraction initiale (surnageant de culture) active obtenue après centrifugation et filtration de la culture, ont subi une concentration par une chromatographie en phase inverse, suivie d'une purification par passage dans une colonne échangeuse de cations et finalement d'une purification par chromatographie liquide en phase inverse semi-préparative puis analytique.

1.1. Préparation de l'extrait de culture

A partir d'une préculture de 5ml de la souche productrice, 2 L de MRS bouillon ont étéensemencés et incubés pendant 18 h à 34°C à raison de 0,1%. Les cellules ont été éliminées par centrifugation à 8000 tr/min pendant 20 min à 4°C. Le surnageant est filtré par la suite sur une membrane de porosité 0,45µm (Macherey-Nagel, Hoerdt, France). Le filtrat obtenu est ajusté à un pH de 5,5 à 6,5 (en fonction des bactériocines) avec une solution de NaOH 1M. On obtient une fraction initiale (fraction I), dont l'activité est quantifiée par le test de la dilution critique.

1.2. Concentration par chromatographie flash en phase inverse

Cette étape de purification permet la concentration de la bactériocine, en éliminant certaines impuretés et en réduisant le volume de la fraction initiale contenant les peptides actifs. Les bactériocines de la fraction initiale sont concentrées et partiellement purifiées par passage sur une phase solide apolaire de silice greffée avec des fonctions alkyles C18 (poids

de la résine 150g, taille de particule 40-60 μm). Le lavage et l'équilibrage de la colonne sont faits par de l'eau ultra-pure additionnée de 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA). La fraction initiale est injectée à un débit de 8 ml/min. et l'élution est effectuée par un mélange d'acétonitrile et d'eau ultra-pure contenant 0,1% de TFA à un débit de 5ml/min. Le gradient linéaire suivant a été utilisé: 0 à 100% d'acétonitrile en 60 min. Des fractions de 10 ml sont collectées et testées par la méthode des spots décrite précédemment. Les fractions d'intérêt sont ainsi détectées et aucun autre moyen de détection n'est utilisé. Celles révélant une activité inhibitrice sont soumises à l'évaporation dans un évaporateur sous vide à froid Speed Vac (SPD121P, Thermo Electro, Asheville, USA), pour éliminer l'acétonitrile. Ces fractions actives réunies constituent la fraction I (fraction I).

1.3. Purification par échange de cations

La colonne échangeuse de cations SP-sépharose (longueur 100 mm, diamètre interne 26 mm, taille de particule 34 μm , Amersham Biosciences, Orsay, France) est équilibrée avec une solution d'acétate de sodium 20 mM (tampon A) à un pH déterminé pour chaque bactériocine (de 5,5 à 6,5). La fraction I contenant la bactériocine est chargée sur la colonne à un débit de 5ml/min. Après un lavage de la phase stationnaire par le tampon A, les molécules de bactériocines retenues sont éluées avec le gradient linéaire suivant: 0 à 100% de NaCl 1 M (tampon B) en 60 min, dans le tampon A et au même pH que ce dernier à un débit de 5ml/min. Des fractions de 10 ml sont collectées et testées, et celles présentant une activité inhibitrice constituent la fraction II (fraction II).

1.4. Purification par chromatographie en phase inverse (HPLC)

La purification lors de cette dernière étape se base sur le caractère hydrophobe de la bactériocine. La fraction II active recueillie a été injectée sur une colonne Hypersil Gold apolaire de silice greffée avec des fonctions alkyles C8 (dimension 250x10 mm, taille de particule 5 μm , porosité 180 Å, Varian, Les Ulis, France). C'est une colonne semi-préparative montée sur un système HPLC Ultimate 3000 (Thermo Scientific, California, USA) contrôlé par le logiciel Chromeleon 6.8. Après équilibrage de la colonne avec de l'eau ultra-pure contenant 0,1% de TFA, la fraction II est chargée dans la colonne à un débit de 5ml/min. Un lavage de la colonne avec un mélange eau/acétonitrile (80% / 20% ; v/v) est effectué pendant 10 min à un débit de 4ml/min (afin d'éliminer les protéines autres que les bactériocines dont on est sûr qu'ils ne sont pas élués à 20% d'acétonitrile suite à des essais préliminaires de

purifications). La bactériocine est ensuite éluée avec un gradient linéaire (0 à 90% d'acétonitrile à 0,1% de TFA dans de l'eau ultra-pure à 0,1% de TFA pendant 54 min) à un débit de 2 ml/min. La bactériocine éluée est détectée avec un détecteur UV-Vis à barrettes de diodes (Thermo Scientific) et des fractions de 2 ml sont collectées et testées selon la méthode des spots. Les fractions actives correspondant au même pic d'élution sont réunies en une seule fraction (fraction III), afin de subir une deuxième chromatographie. Cette dernière est effectuée sur une colonne C18 analytique de type Sunfire (dimension 250 x 4,6 mm, taille de particule 5 µm, Waters, St. Quentin Fallavier, France) montée sur le même système chromatographique. La fraction III est chargée à un débit de 2 ml/min et éluée suivant le gradient suivant: de 20 à 50% d'acétonitrile en 30 min, de 50 à 100% en 10 min et 100% en 5 min (soit 45 min d'élution). Des fractions de 2ml sont collectées et sont testées selon la méthode des spots. Les fractions actives, représentant dans la mesure du possible un seul pic chromatographique, sont rassemblées et reprises dans de l'eau à 0,1% de TFA avant d'être rechromatographiées autant de fois que nécessaire (soit dans les mêmes conditions soit en les changeants) pour obtenir la bactériocine pure. Cette dernière est ensuite séchée et conservée à -20°C pour la suite de travail.

Préparation de l'extrait de culture

- 1L de la culture productrice dans le milieu MRS
- Centrifugation 8000 tr/min pdt 20 min à 4 °C
- Filtration sous vide par des filtres de porosité 0,45µm



Concentration par chromatographie flash en phase inverse

- Phase stationnaire:** apolaire, silice greffée de fonctions alkyles C18 (poids de la résine 150 g, taille de particule 40-60 µm, pression max 90 psi, débit max 45 ml/min). Pas de détecteur en sortie de colonne.
- Phase mobile:** acétonitrile + TFA 0,1%
- Collecte des fractions:** 1 fraction/2min



Purification par échange de cations

- Phase stationnaire:** SP-sépharose greffée de chaînes latérales avec des groupements anioniques (longueur 100 mm, diamètre interne 26 mm, taille de particule 34 µm). Pas détecteur en sortie de colonne.
- Phase mobile:** acétate de sodium 20mM + NaCl 1M
- Collecte des fractions:** 1 fraction/2min



Purification par chromatographie en phase inverse (HPLC)

Colonne C8 semi-préparative

- Phase stationnaire:** silice greffée de fonctions alkyles C8 (taille de particule 5 µm, dimension 250x10 mm),
- Colonne montée sur une chaîne HPLC-RP / détection des bactériocines à l'aide d'un détecteur Varian
- Phase mobile:** acétonitrile + TFA 0,1%
- Elution:** gradient linéaire d'acétonitrile dans de l'eau distillé contenant TFA 0,1% à un débit de 2 ml/min

Colonne C18 analytique

- Phase stationnaire:** silice greffée de fonctions alkyles C18 (taille de particule 5 µm, dimension 250x4,6 mm),
- Colonne montée sur une chaîne HPLC-RP / détection des bactériocines à l'aide d'un détecteur Varian
- Phase mobile:** acétonitrile + TFA 0,1%
- Elution:** gradient linéaire d'acétonitrile dans de l'eau distillé contenant TFA 0,1% à un débit de 2 ml/min

Figure 12. Schéma des étapes utilisées pour la purification des bactériocines.

2. Détermination de la masse moléculaire

La masse moléculaire de la bactériocine purifiée est déterminée par injection directe à l'aide d'une pompe à seringue dans un spectromètre de masse à temps de vol et à source d'ionisation electrospray (ESI- TOF MS, contrôlé par le logiciel micrOTOF Control 3.0 (Bruker Daltonics, Billerica, USA). Un fort champ électrique par ionisation electrospray (ESI) est appliqué aux molécules injectées traversant un capillaire. Des ions en phase gazeuse sont générés, et sont fragmentés suivant leurs énergies internes. Cela produit de fines gouttelettes (électrospray) et provoque l'accumulation des charges à la sortie du capillaire. Le couplage de la source d'ionisation (ESI) avec l'analyseur quadripolaire à temps de vol (TOF), permet la mesure du temps de parcours des ions préalablement accélérés dans un champ électrique à travers une zone libre où règne un vide poussé. Ce couplage permet ainsi d'enregistrer des spectres avec de nombreux ions multichargés dans une gamme de m/z allant de 50 à 3000. La liste de pics est générée et les spectres de masse sont déconvolués à l'aide du logiciel Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonics) afin de calculer la masse moyenne de la bactériocine.

3. Séquençage des gènes codant pour la production de bactériocines

Dans certains cas, l'identification de la bactériocine a été effectuée par la recherche des gènes de structure possible. Ainsi, une PCR par amplification de l'ADN génomique total de ces souches a été réalisée. Les amorces spécifiques utilisées sont celles correspondant aux bactériocines suivantes: entérocin AS-48 ; entérocin A, B et P; entérocin L50A et B ; et entérocin 1071 (tableau 7). Les produits de la PCR ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose. Un résultat positif signifie la présence du gène codant pour la bactériocine.

Tableau 7. Amorces utilisées pour l'amplification des gènes codant pour les entérocin A, B, P, entérocin AS-48, entérocin L50A, L50B et entérocin 1071A et 1071B.

Bactériocines	Séquences oligonucléotidiques	Références
Enterocin A	f:AAATATTATGGAAATGGAGTGAT r: GCACTCCCTGGAATTGCTC	(Du Toit <i>et al.</i> , 2000)
Enterocin B	f:GAAAATGATCACAGAATGCCTA r: GTTGCAATTTAGAGTATACATTTG	(Du Toit <i>et al.</i> , 2000)
Enterocin P	f:TATGGTAATGGTGTTTATTGTAAT r: ATGCCCATACCTGCCAAC	(Du Toit <i>et al.</i> , 2000)
Enterocin AS-48	f:GAGGAGTTTCATGATTTAAAGA r: CATATTGTTAAATTACCAAGCAA	(Du Toit <i>et al.</i> , 2000)
Enterocins L50A and L50B	f:TGGGAGCAATCGCAAATTTAG r:ATGCCCATCCTTCTCCAAT	(Du Toit <i>et al.</i> , 2000)
Enterocins 1071A and 1071B	f:CCTATTGGGGGAGAGTCGGT r:ATACATTCTTCCACTTATTTTT	(Ben Omar <i>et al.</i> , 2004)

4. Détermination de la séquence peptidique

La détermination de la séquence peptidique des bactériocines purifiées a été effectuée soit par séquençage par dégradation d'Edman, soit par spectrométrie de masse. De plus, une PCR pour une partie des bactéries identifiées a été effectuée, afin de vérifier la présence des gènes codant pour certaines bactériocines.

4.1. Séquençage par dégradation d'Edman

La dégradation d'Edman permet le séquençage peptidique en identifiant l'acide aminé N-terminal du peptide. Elle a été réalisée avec un séquenceur Applied Biosystems modèle 492 (N° de série 9510287J). La réaction fait interagir le peptide avec le réactif d'Edman, le phénylisothiocyanate (PITC) à pH alcalin. Le composé résultant de cette réaction phénylthiocarbamyle (PTC) est traité par un acide anhydre qui permet la libération de l'acide aminé N-terminal. Le dérivé de cet acide aminé, le phenylthiohydantoïne généré à chaque cycle est identifié et quantifié par HPLC (Applied Biosystems Model 140C) en utilisant le système d'analyse des données Applied Biosystems (software Procise PC v2.1). La répétition successive de ce cycle de dégradation permet la détermination de toute la séquence peptidique de la bactériocine.

Ce séquençage a été réalisé à l'institut de Biologie Structurale, Plateforme Seq3A: Séquençage et Analyse d'Acides Aminés, Groupe Réponse Immunitaire aux Pathogènes et au Soi Altéré de Grenoble.

4.2. Analyse par spectrométrie de masse

L'identification des bactériocines purifiées a été effectuée également par spectrométrie de masse en tandem couplée à une chromatographie liquide (ou LC-MS/MS). Une première étape de réduction des ponts disulfures, formés par des cystéines pouvant empêcher l'hydrolyse enzymatique et par la suite le séquençage peptidique, suivie d'alkylation pour empêcher la reformation des ponts disulfures réduits est indispensable. Par la suite, la bactériocine réduite et alkylée est incubée avec de la trypsine bovine (Promega, Madison, WI, USA) pendant une nuit à température ambiante pour la digestion enzymatique avant d'être analysée par spectrométrie de masse.

Les fragments peptidiques générés ont été analysés par nano LC-MS/MS : colonne C18 sur système HPLC-chip/MS 1100 (Agilent Technology, Palo alto, CA, USA), couplé à un spectromètre de masse à source d'ionisation electrospray (ESI) et détecteur à trappe d'ions

HCT ultra (Bruker Daltonics, Breme, Allemagne). Les spectres de masse expérimentaux obtenus sont comparés aux spectres théoriques de la banque de donnée utilisée (NCBIInr), ce qui permet la déduction de la séquence peptidique des bactériocines.

Cette identification a été effectuée au Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique, Département des Sciences Analytiques, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, UMR 7178 (CNRS-UDS), Strasbourg.

III. Etude de l'activité des bactériocines purifiées

1. Spectres d'activité

Le spectre d'activité sur milieu solide des bactériocines purifiées a été déterminé sur des dizaines d'espèces incluant des bactéries lactiques et des bactéries pathogènes des genres *Bacillus*, *Listeria* et *Staphylococcus*. L'activité inhibitrice a été mise en évidence par la méthode des spots. Un aliquote de 10 µl de la bactériocine pure mise en solution dans de l'eau ultra-pure est utilisé pour le test et l'évaluation de l'activité est faite par l'observation et la mesure du diamètre d'inhibition. Le test est refait 4 à 5 fois afin de confirmer le résultat.

Un spectre d'activité en milieu liquide a également été déterminé pour certaines bactériocines purifiées et identifiées. Dans chaque puits d'une microplaque de 96 puits, contenant du milieu de culture MRS, sont additionnés 3 µl d'une culture jeune de la souche cible. A partir de la bactériocine pure, mise en solution dans de l'eau ultra-pure, trois dilutions sont réalisées (1000^{ème}, 200^{ème} et 30^{ème}) pour un volume final de 300 µl dans chaque puits, selon le modèle représenté dans le tableau 8. Toutes les plaques sont incubées pendant 48 h dans un lecteur de microplaques (Varioskan Flash, Thermo Scientific, Courtaboeuf, France). Pour chaque puits, l'absorbance est mesurée toutes les 15 min à une longueur d'onde de 600 nm.

Tableau 8. Exemple d'un plan de plaque de 96 puits pour la détermination du spectre d'activité d'une bactériocine sur plusieurs souches cibles

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Milieu+ cible	A	297µl MRS +3µl B1	297µl MRS +3µl B3	297µl MRS +3µl E2	297µl MRS +3µl E5	297µl MRS +3µl E17	297µl MRS +3µl E21	297µl MRS +3µl E29	297µl MRS +3µl L4	297µl MRS +3µl L7	297µl MRS +3µl L10	297µl MRS +3µl L17	297µl MRS +3µl L19
1000 ^e	B	294µl MRS +3µl C +3µl B1	294µl MRS +3µl C +3µl B3	294µl MRS +3µl C +3µl E2	294µl MRS +3µl C +3µl E5	294µl MRS +3µl C +3µl E17	294µl MRS +3µl C +3µl E21	294µl MRS +3µl C +3µl E29	294µl MRS +3µl C +3µl L4	294µl MRS +3µl C +3µl L7	294µl MRS +3µl C +3µl L10	294µl MRS +3µl C +3µl L17	294µl MRS +3µl C +3µl L19
200 ^e	C	291µl MRS +6µl C +3µl B1	291µl MRS +6µl C +3µl B3	291µl MRS +6µl C +3µl E2	291µl MRS +6µl C +3µl E5	291µl MRS +6µl C +3µl E17	291µl MRS +6µl C +3µl E21	291µl MRS +6µl C +3µl E29	291µl MRS +6µl C +3µl L4	291µl MRS +6µl C +3µl L7	291µl MRS +6µl C +3µl L10	291µl MRS +6µl C +3µl L17	291µl MRS +6µl C +3µl L19
30 ^e	D	287µl MRS +10µl C +3µl B1	287µl MRS +10µl C +3µl B3	287µl MRS +10µl C +3µl E2	287µl MRS +10µl C +3µl E5	287µl MRS +10µl C +3µl E17	287µl MRS +10µl C +3µl E21	287µl MRS +10µl C +3µl E29	287µl MRS +10µl C +3µl L4	287µl MRS +10µl C +3µl L7	287µl MRS +10µl C +3µl L10	287µl MRS +10µl C +3µl L17	287µl MRS +10µl C +3µl L19
Milieu+ cible	E	297µl MRS +3µl B2	297µl MRS +3µl S8	297µl MRS +3µl E3	297µl MRS +3µl E6	297µl MRS +3µl E19	297µl MRS +3µl E27	297µl MRS +3µl L2	297µl MRS +3µl L6	297µl MRS +3µl L9	297µl MRS +3µl L15	297µl MRS +3µl L18	297µl MRS +3µl L21
1000 ^e	F	294µl MRS +3µl C +3µl B2	294µl MRS +3µl C +3µl S8	294µl MRS +3µl C +3µl E3	294µl MRS +3µl C +3µl E6	294µl MRS +3µl C +3µl E19	294µl MRS +3µl C +3µl E27	294µl MRS +3µl C +3µl L2	294µl MRS +3µl C +3µl L6	294µl MRS +3µl C +3µl L9	294µl MRS +3µl C +3µl L15	294µl MRS +3µl C +3µl L18	294µl MRS +3µl C +3µl L21
200 ^e	G	291µl MRS +6µl C +3µl B2	291µl MRS +6µl C +3µl S8	291µl MRS +6µl C +3µl E3	291µl MRS +6µl C +3µl E6	291µl MRS +6µl C +3µl E19	291µl MRS +6µl C +3µl E27	291µl MRS +6µl C +3µl L2	291µl MRS +6µl C +3µl L6	291µl MRS +6µl C +3µl L9	291µl MRS +6µl C +3µl L15	291µl MRS +6µl C +3µl L18	291µl MRS +6µl C +3µl L21
30 ^e	H	287µl MRS +10µl C +3µl B1	287µl MRS +10µl C +3µl S8	287µl MRS +10µl C +3µl E3	287µl MRS +10µl C +3µl E6	287µl MRS +10µl C +3µl E19	287µl MRS +10µl C +3µl E27	287µl MRS +10µl C +3µl L2	287µl MRS +10µl C +3µl L6	287µl MRS +10µl C +3µl L9	287µl MRS +10µl C +3µl L15	287µl MRS +10µl C +3µl L18	287µl MRS +10µl C +3µl L21

MRS: milieu de culture utilise

C: bactériocine testée

B1,B2, B3, S8, E2, E3, E5, E6, E17, E19, E21, E27, E29, L2, L4, L6, L7, L9,L10, L15, L17, L18, L19, L21: souches cibles

La solution de la bactériocine utilisé pour préparer la dilution 1/1000 est dilué précédemment au 10^{ème}, tandis que celle pour préparer la dilution 1/200 est dilué au 4^{ème}. Le volume total dans chaque puits correspond alors: milieu de culture bouillon MRS+ bactériocine + souche cible, les puits témoins (A1 à A12 et E1 à E12) ne contiennent pas la bactériocine.

2. Mode d'action

La détection de la viabilité des populations bactériennes en fonction de l'intégrité de leurs membranes cellulaires a été quantifiée en utilisant Le kit LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability (Molecular probe, L7012, Eugene, Oregon, USA). Ce dernier se compose d'un mélange de deux fluorochromes le SYTO 9 (A) et l'iodure de propidium (B), qui diffèrent par les caractéristiques spectrales et par l'aptitude à pénétrer dans les cellules saines (Wattanaphansak *et al.*, 2005). Le SYTO 9 émet une fluorescence verte lorsqu'il pénètre dans toutes les cellules (intacte et endommagé). En revanche, l'iodure de propidium ne pénètre que dans les bactéries avec des membranes endommagées produisant une fluorescence rouge en concurrence avec le SYTO 9 pour les sites de liaisons. Ainsi l'activité de SYTO 9 est réduite par la présence de l'iodure de propidium lorsqu'un échantillon contient des bactéries avec des membranes endommagées (Haugland, 1996).

Des souches cibles sensibles et résistantes ont été utilisées pour tester l'effet de différentes bactériocines sur la perméabilité membranaire. Les bactéries cibles sont cultivées dans du bouillon MRS à 34°C pendant 18h. Les cellules bactériennes recueillies après centrifugation et lavage, sont remises en suspension dans de l'eau physiologique. La taille de la population de cellules cibles a été standardisée en ajustant l'absorbance initiale à 600 nm à 1 pour toutes les cultures, afin d'avoir le même niveau de fluorescence initiale. Après traitement de 100 µl de la suspension cellulaire cible avec une quantité de bactériocine (30µl), la plaque a été incubée à température ambiante pendant 15 min sous agitation. Ensuite, un volume total de 100 µl des deux fluorochromes A et B (rapport 1 :1) est rajouté. Le signal de fluorescence a été mesuré par un lecteur Thermo Scientific Varioskan flash.

Afin d'optimiser la technique de dosage, différentes longueurs d'onde d'excitation et d'émission pour les deux réactifs A et B ainsi que différentes concentrations ont été testées. Les longueurs d'ondes ainsi que les concentrations retenues sont indiquées en gras sur les tableaux 9 et 10. Ils correspondent aux rapports optimaux pour l'enregistrement d'un signal de fluorescence maximale.

Tableau 9. Différentes longueurs d'ondes d'excitation et d'émission testées pour le SYTO 9 et l'Iodure de Propidium.

Longueurs d'onde (nm)			
SYTO 9 (fluorescence verte)		IP (fluorescence rouge)	
Excitation	Emission	Excitation	Emission
483	530	430	617
485	630	305	617
485	530	340	630
		305	630
		535	617
		535	630
		485	630

Tableau 10. Combinaisons à différents pourcentage du SYTO 9 et de l'Iodure de propidium testées.

Fluorochrome	Combinaisons		
	1	2	3
SYTO 9	25%	50%	75%
IP	75%	50%	25%

IV. Etude de la résistance de *L. monocytogenes*

La capacité de *L. monocytogenes* 3b LC 40 à produire des mutants résistants aux bactériocines produites par les deux souches *L. plantarum* B (mono-productrice) et *L. paracasei* GRU3 (multi-productrice) a été testée. Ces deux souches ont été incubées dans du bouillon MRS pendant 18 h à 34°C. A partir du filtrat actif de la culture, des dilutions successives de ½ dans du MRS bouillon ont été préparées. Chaque solution a étéensemencée par la souche cible, *L. monocytogenes* 3b LC 40 et plusieurs volumes d'ensemencement ont été testés. Tous les tubes sont incubés à 37°C, jusqu'à ce que le milieu devienne trouble. La plus grande dilution montrant une croissance, correspond *a priori* à la première génération mutante de *L. monocytogenes* 3b LC 40 (G1). En gardant la même dilution, le test a été refait pour l'obtention d'autres générations (G2, G3 et G4). L'activité inhibitrice des bactériocines produites par *L. plantarum* B et *L. paracasei* GRU3 contre les quatre générations de *L. monocytogenes* 3b LC 40 a été évaluée par le test des spots.

V. Application des souches productrices des bactériocines B et GRU3 dans un modèle de Lben

La capacité des deux souches productrices de bactériocines *L. plantarum* B et *L. paracasei* GRU3 à inhiber *L. monocytogenes* 3b LC 40 dans un modèle de produit alimentaire traditionnel fermenté a été initiée comme application préliminaire de ce travail. Toutes les souches sont cultivées dans du MRS bouillon, incubées à 37°C pendant 18h et centrifugées à 2700 g pendant 15 min. Le culot est lavé deux fois et repris dans de l'eau physiologique. La suspension cellulaire obtenue est diluée de façon à obtenir une concentration d'environ 10^7 UFC /ml, pour les souches productrices et 10^2 UFC /ml pour la souche cible. Du lait UHT stérile estensemencé à raison de : 1% à partir de la suspension de la souche productrice et 1% de la suspension de la souche cible. Un flacon de lait témoin estensemencé seulement avec la souche cible et en absence de la souche productrice de bactériocine. Après incubation à 37°C, des prélèvements sont effectués à différents temps d'incubation (0h, 3h, 6h, 9h... 24h) pour le dénombrement de la population de *L. monocytogenes* 3b LC 40.

CHAPITRE 3

Résultats et discussion

Résultats

I. Recherche de bactéries productrices des bactériocines

1. Isolement et purification

Les 50 échantillons analysés (tableau 11) ont permis l'isolement de 174 isolats sur différents milieux de culture M17, MRS et MSE. Les colonies ont été purifiées, et les tests préliminaires ont montré que les isolats possédaient les caractéristiques des bactéries lactiques à savoir: des formes coques ou bacilles, immobiles, Gram positif, catalase négative et oxydase négative.

Tableau 11. Origines des échantillons analysés.

Type d'échantillon	Origine	Code
Câpres	OuladJamaa	C1
	OuladDawd	C2
Poivron	Bhalil	PV1
Olives (OV : olives vertes ON: olives noires)	Bhalil	OV1
	Laboratoire ESTF	OV2
	Bhalil	OV3
	Bhalil	ON4
	Laboratoire ESTF	OV5
	Bhalil	ON6
	Errachidia	OV7
	OuladDawd	OV8
	Fès	OV9
	Bhalil	OV10
	Bhalil	OV11
	Sefrou	OV 12
	Bhalil	OV13
	Bhalil	OV14
	Sefrou	OV15
	Bhalil	ON16
	Sefrou	OV17
	Bhalil	OV18
	Sefrou	OV19
	Fès	ON20
Lben	Sefrou	Lb1
	Taounate	Lb2
	Tétouane	Lb3
	Salé	Lb4
	Bhalil	Lb5
	Fès	Lb6

	Guerssif	Lb7
	Bhalil	Lb8
Jben	Fès (Ancienne médina)	Jb1
	Fès (Narjiss)	Jb2
Lait cru	Bhalil	Lc1
Beurre	Bhalil	B
Fromages	Reblochon Fruitier, Auchan Lait Cru de Vache	E9
	Reblochon Fruitier, Auchan Lait Cru de Vache	E14
	Camembert, Auchan Lait Cru de Vache	E16
	Reblochon de Savoie, Pochat, Lait Cru de Vache	P1
	Emmental Grand Cru	EGC3
	Comté Fort des Rousses	CFR1
	Gruyère Bio AOP	GRU3
	Salers AOP	SAL1
	Cantal AOP	CAN1
	Cantal AOP	CAN2
	Morbier au Lait Cru Bio Auchan	MOR2
	Morbier Bio Jean Perrin	MJP1
	Ossau Iraty Fermier AOP 2	OIF3
	Brie de Meaux AOP Auchan	BAA2
	St. Nectaire fermier AOP	SNF1
Munster au lait cru Le petit Sapin	L3	

2. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne

L'évaluation de l'effet antagoniste des souches purifiées a été réalisée par des tests directs et indirects. Le premier test est un contact direct entre les bactéries à tester et les bactéries indicatrices. Il permet la réalisation d'un criblage des bactéries possédant un effet antimicrobien (figure 12). Le deuxième test est indirect et permet l'analyse du surnageant des cultures productrices par la méthode des spots (figure 13). Il confirme l'activité inhibitrice des souches testées et permet la sélection des plus performantes. Une vingtaine de bactéries sont utilisées comme souches indicatrices afin d'établir un spectre d'activité préliminaire des différents extraits actifs et permettre le choix de la souche indicatrice sensible qui servira pour les tests ultérieurs. Dix-sept isolats producteurs ont été sélectionnés pour leur pouvoir antagoniste (tableau 12). Ils montrent un spectre d'activité plus ou moins large affectant des espèces de bactéries lactiques, ainsi que des espèces potentiellement pathogènes appartenant aux genres *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Listeria* ou encore *Serratia*. Pour chaque isolat producteur, une souche indicatrice sensible a été choisie pour suivre l'activité antimicrobienne au cours des différentes étapes de purification.

Tableau 12. Spectres d'activité des extraits de culture des différents isolats producteurs sélectionnés. L'activité a été quantifiée par mesure des diamètres des zones d'inhibition obtenues par la méthode des spots.

Espèce indicatrice	Référence	Diamètres des zones d'inhibition en mm															
		E14	GRU3	SAL1	CAN1	CAN2	MJP1	SNF1	OIF3	P1	E16	BAA2	T4	A4	LS3	B	C
<i>E. raffinosus</i>	C3VS/361	8	-8	13	12	14	12	18	12	13	13	15	ND	ND	ND	ND	ND
<i>L. monocytogenes3b</i>	LC 40	11	0	10	12	13	15	18	16	19	20	20	ND	ND	ND	ND	ND
<i>S. enteritidis</i>	LC 216	12	12	10	11	13	12	15	12	13	14	16	0	0	13	14	13
<i>L. sakei ssp. Sakei</i>	ATCC 15521	12	11	10	12	15	12	14	14	15	14	15	0	0	13	15	14
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	8	0	~ 8	9	15	11	14	12	14	14	15	10	12	12	10	12
<i>E. faecalis</i>	WHE 96	8	~ 6	0	10	14	0	13	12	14	14	14	15	16	14	10	15
<i>E. faecium</i>	WHE 81	~ 5	0	~ 5	10	17	13	13	13	14	14	15	14	15	15	16	13
<i>E. faecium</i>	HA	0	~ 5	10	8	15	13	15	13	17	14	14	12	13	13	14	11
<i>E. faecium</i>	OB	0	0	10	9	15	13	16	12	15	15	17	ND	ND	ND	14	ND
<i>E. faecium</i>	OCB	0	0	11	10	14	13	15	12	15	15	14	15	14	12	ND	13
<i>L. innocua</i>	LC 14	0	0	10	13	16	12	13	13	13	15	15	ND	ND	ND	15	ND
<i>E. faecalis</i>	OA	0	0	10	8	15	8	15	12	14	15	15	0	0	14	ND	4
<i>L. lactis</i>	RO50	8	0	9	13	0	12	0	0	0	0	0	14	14	0	15	0
<i>L. plantarum</i>	WHE 92	7	~ 7	9	9	0	0	~ 10	~ 6	~ 14	0	0	ND	ND	ND	0	ND
<i>E. faecium</i>	JA	-5	0	~ 8	10	0	~ 8	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
<i>P. acidilactici</i>	LC	0	0	11	0	13	9	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
<i>L. lactis</i>	WHE 53	~ 5	0	12	11	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
<i>S. marcescens</i>	ATCC 13880	0	~ 5	0	0	0	0	~ 5	0	-5	0	0	~ 13	~ 9	~ 12	~ 12	~ 11
<i>S. xylosum</i>	LC 57	0	0	9	9	0	0	0	~ 5	0	0	0	12	12	0	0	0
<i>L. monocytogenes 1/2c</i>	LC 12	-10	0	10	-15	-12	~ 15	~ 16	~ 12	14	~ 12	0	ND	ND	ND	ND	ND

~ : Zone trouble

ATCC: American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA);

LC: collection du laboratoire;

ND : non déterminé.



Figure 13. Exemple des zones d'inhibitions obtenues par le test direct.

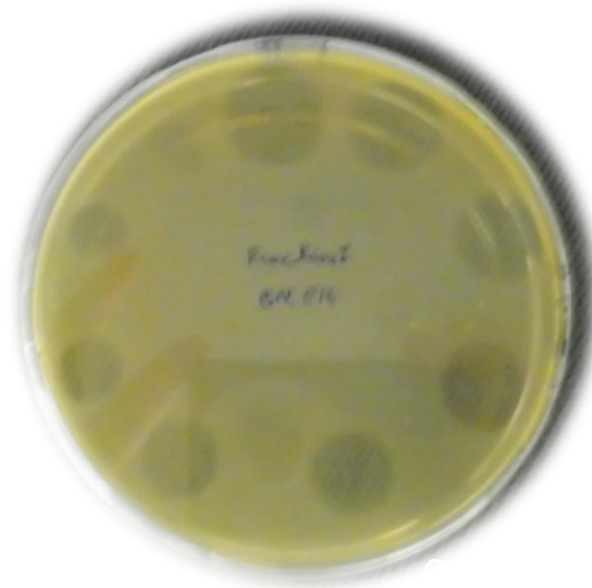


Figure 14. Exemple des zones d'inhibitions obtenues par la méthode des spots.

3. Identification des isolats actifs

Les identifications génotypiques des souches dotées d'activité inhibitrice ont démontré que les souches appartenaient à quatre genres: 9 souches d'*Enterococcus* représentées par trois espèces, *E. faecalis*, *E. faecium* et *E. durans*, 6 souches de *Lactobacillus* représentées par deux espèces, *L. plantarum* et *L. paracasei* et 5 souches de *Pediococcus* représentées par l'espèce *P. acidilactici* et 1 souche de *Carnobacterium maltaromaticum* (CPN1). Le tableau 13 montre les résultats des identifications obtenues, soit par PCR et séquençage du gène de l'ARN 16S (*E. faecalis* SAL1 et CAN1, *E. faecium* E16 et E14, *L. plantarum* B, C et LS3 et *P. acidilactici* P1), soit par spectrométrie de masse MALDI Biotyper (*E. durans* A4 et T4, *L. plantarum* MJP1, *L. paracasei* GRU3, *P. acidilactici* CAN2, OIF3, BAA2, SNF1 et *C. maltaromaticum* CPN1).

Tableau 13. Identification des souches dotées d'activité antimicrobienne.

Code	Espèce identifiée	Origine	Technique
CPN1	<i>C. maltaromaticum</i>	Camembert, petit Normand	Spectrométrie de masse
A4	<i>E. durans</i>	Poivron fermenté	Spectrométrie de masse
T4	<i>E. durans</i>	Lben	Spectrométrie de masse
SAL1	<i>E. faecalis</i>	Salers AOP	Séquençage du gène de l'ARN 16S
CAN1	<i>E. faecalis</i>	Cantal AOP	Séquençage du gène de l'ARN 16S
E16	<i>E. faecium</i>	Camembert,	Séquençage du gène de l'ARN 16S
E14	<i>E. faecium</i>	Reblochon	Séquençage du gène de l'ARN 16S
B	<i>L. plantarum</i>	Beurre	Séquençage du gène de l'ARN 16S
C	<i>L. plantarum</i>	Smen	Séquençage du gène de l'ARN 16S
LS3	<i>L. plantarum</i>	Lben	Séquençage du gène de l'ARN 16S
MJP1	<i>L. plantarum</i>	Morbier Bio Jean Perrin	Spectrométrie de masse
GRU3	<i>L. paracasei</i>	Gruyère Bio AOP	Spectrométrie de masse
P1	<i>P. acidilactici</i>	Reblochon de Savoie,	Séquençage du gène de l'ARN 16S
CAN2	<i>P. acidilactici</i>	Cantal AOP	Spectrométrie de masse
OIF3	<i>P. acidilactici</i>	Ossau Iraty Fermier AOP 2	Spectrométrie de masse
BAA2	<i>P. acidilactici</i>	Brie de Meaux AOP Auchan	Spectrométrie de masse
SNF1	<i>P. acidilactici</i>	St. Nectaire fermier AOP	Spectrométrie de masse

II. Purification et étude structurale des bactériocines

Le protocole de purification mis au point pour l'ensemble des bactériocines produites par les 17 bactéries retenues est composé de quatre étapes principales telles qu'elles sont décrites dans matériel et méthodes.

1. Bactériocine du genre *Carnobacterium*

La souche *C. maltaromaticum* CPN1 a été isolée à partir d'un fromage de type Camembert à base de lait cru de la marque Petit Normand. En se basant sur le spectre d'activité de l'extrait brut de la culture bactérienne, la souche *L. sakei ssp. sakei* ATCC 8115521 a été retenue pour tester l'activité antimicrobienne de *C. maltaromaticum* CPN1 au cours des différentes étapes de purification. Cette dernière a été effectuée comme décrit dans matériel et méthodes, avec un échange de cation à pH 6,5. Sur les différentes fractions issues de la chromatographie semi-préparative sur phase C8, une seule a montré une activité notable. Elle correspond à un pic avec un temps de rétention de 9 min. Elle est alors diluée dans de l'eau contenant 0,1% de TFA et chargée sur une colonne C18 analytique montée sur la même chaîne

HPLC. Un pic est obtenu à un temps de rétention de 9,7 min qui correspond au maximum de l'activité antimicrobienne mesurée par le test des spots, c'est le peptide CPN1 pur (figure 14).

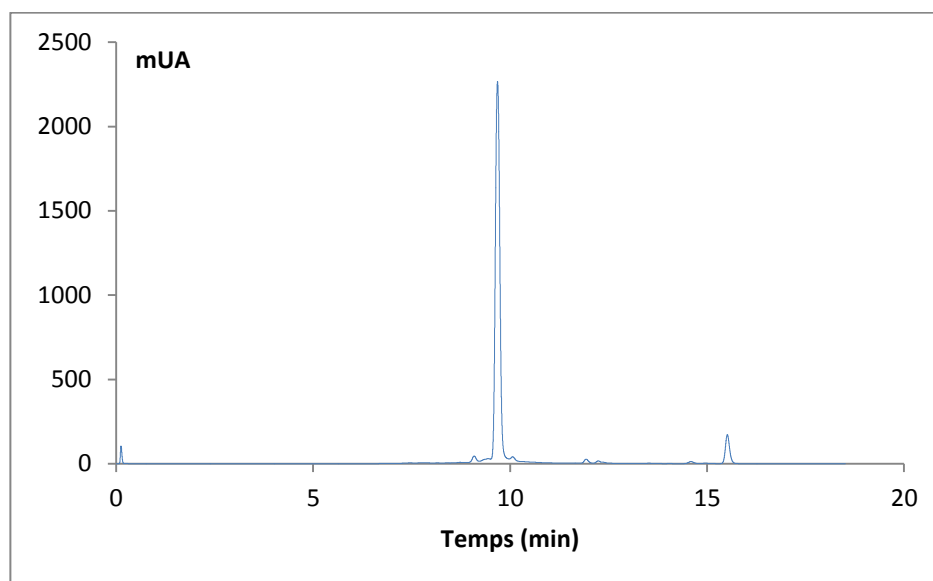


Figure 15. Profil chromatographique à 280 nm après séparation sur colonne C18 analytique de la fraction III de *C. maltaromaticum* CPN1 avec un gradient linéaire de 20 à 50% d'acétonitrile en 30 min, de 50 à 100% en 10 min et 100% en 5 min

La masse moléculaire du peptide CPN1, déterminée par spectrométrie de masse ESI-Q-TOF, est de 4427,10 Da, ce qui ne correspond à aucun peptide antimicrobien déjà décrit (figure 15). Par ailleurs, le spectre de masse a permis de confirmer la pureté de l'échantillon obtenu.

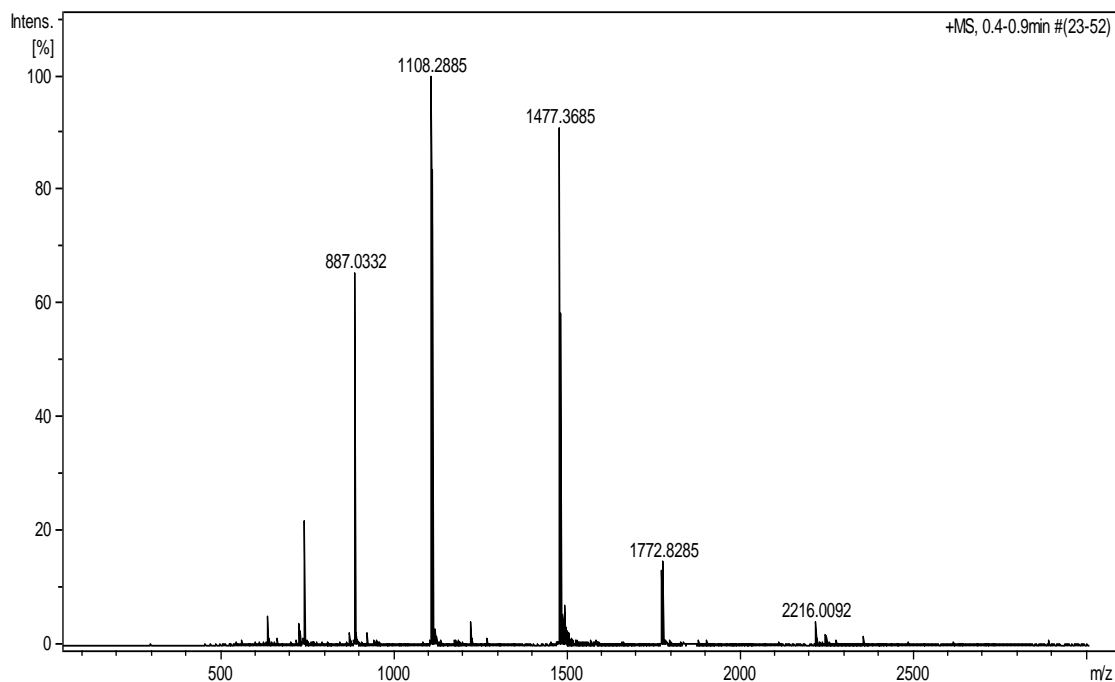


Figure 16. Spectre de masse réalisé par l'ESI-Q-TOF du peptide CPN1 produit par *C. maltaromaticum* CPN1.

Le peptide CPN1 ainsi purifié a par la suite été soumis au séquençage par dégradation d'Edman sur un séquenceur de protéine Applied Biosystems modèle 492. L'analyse de la séquence obtenue avec le système d'analyse des données Applied Biosystems (software Procise PC v2.1) a permis l'identification d'une nouvelle séquence linéaire de 44 acides aminés non modifiés (tableau 14). Le peptide contient, le motif consensus de classe IIa «YGNGL» à son extrémité N-terminale.

La masse calculée de cette séquence est de 4429,11 Da, soit deux Da de plus que celles obtenue par spectrométrie de masse, ce qui suggère la présence d'un pont disulfure entre les deux résidus cystéine en positions 9 et 14. Ceci a été confirmé par la réduction/ alkylation de la bactériocine. Cette nouvelle bactériocine a été nommée Maltaricine CPN.

Tableau 14. Séquence peptidique de la maltaricine CPN obtenue par dégradation d'Edman.

Peptide	Séquence peptidique	Bactériocine
CPN1	KYYGNGLSCNKKGCTVDWGTGTAIGIIGNNAAANWATGGAAGWNKG	Maltaricine CPN

2. Bactériocines du genre *Enterococcus*

Les bactéries du genre *Enterococcus* productrices de bactériocines sont au nombre de sept : *E. durans* A4, *E. durans* T4, *E. faecium* E16, *E. faecalis* SAL1, *E. faecalis* CAN1 et *E. faecium* E14 (tableau 13).

2.1. *E. durans* A4 et T4, *E. faecium* E16 et *E. faecalis* SAL1

Les souches *E. durans* A4 et T4 ont été isolées respectivement à partir d'échantillons de Poivron fermenté et de Lben, tandis que les souches *E. faecium* E16 et *E. faecalis* SAL1 ont été isolées à partir d'échantillons de fromages respectivement Camembert et Salers AOP, préparés à base de lait cru. Les spectres d'activités de leurs extraits bruts sont similaires et s'étendent à plusieurs espèces cibles. La souche *E. faecalis* WHE 96 a été retenue comme souche indicatrice pour tester l'activité antimicrobienne au cours des différentes étapes de purification des souches d'*E. durans* A4 et T4. Pour les souches *E. faecium* E16 et *E. faecalis* SAL1, ce sont les souches *E. faecium* OB (E14) et *L. sakei* ssp. *sakei* ATCC 15521 qui ont été retenues comme souches cibles respectivement.

Pour chacune des quatre souches d'*Enterococcus* (A4, T4, E16 et SAL1), les extraits bruts ont été concentrés par chromatographie flash comme décrit auparavant. L'activité inhibitrice des fractions collectées après élution avec de l'ACN a été testée par la technique des spots. Pour chaque souche, un lot de fractions (fractions 7 à 29) a montré une activité

antimicrobienne vis-à-vis de la souche indicatrice utilisée. Pour chacune des quatre souches testées, l'activité majeure a été détectée dans les fractions 16 à 20 (diamètre des zones d'inhibitions entre 15 et 20 mm), qui, réunies, constituent la fraction I. Cette dernière est alors injectée dans la colonne échangeuse de cations à pH 6,0, et les fractions éluées sont testées par la technique des spots. Les fractions 15 à 17, correspondant à l'activité maximale (diamètre des zones d'inhibitions entre 17 et 20 mm), réunies, constituent la fraction II.

Un exemple de chromatogramme obtenu après injection de la fraction II (d'*E. faecium* E16) dans la colonne C8 semi-préparative montée sur une chaîne HPLC est représenté sur la figure 14a. Le test de l'activité antimicrobienne des fractions collectées (toutes les 30 secondes) a montré que le maximum de l'activité (18 mm de diamètre) se situait dans la fraction 22 qui correspond au pic chromatographique retenu à 21 min.

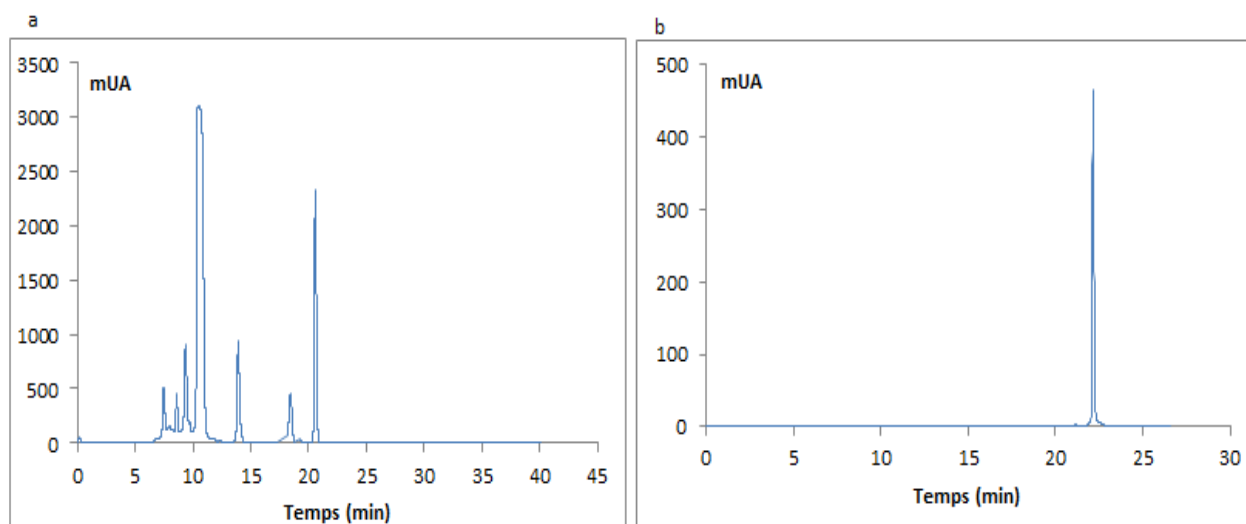


Figure 17. Profil chromatographique à 280 nm. a) après séparation sur colonne C8 semi-préparative de la fraction II d'*E. faecium* E16 avec un gradient linéaire de 0 à 90% d'acétonitrile à 0,1% de TFA dans de l'eau à 0,1% de TFA en 54 min. b) après séparation sur colonne C18 analytique de la fraction III d'*E. faecium* E16 avec un gradient linéaire de 20 à 50% d'acétonitrile en 30 min, de 50 à 100% en 10 min et 100% en 5 min.

Le pic correspondant à la fraction 22 (fraction III) ne présentant pas une pureté suffisante pour une analyse par spectrométrie de masse, cette fraction est alors diluée dans de l'eau contenant 0,1% de TFA et purifiée sur une colonne C18 analytique montée sur une chaîne HPLC. Sur les différentes fractions collectées et testées, une seule a montré une activité majeure. Elle correspond à un pic bien isolé (figure 16b), enregistré à un temps de rétention de 22 min.

Des profils chromatographiques similaires ont été obtenus lors de la purification des bactériocines des espèces d'*E. durans* A4 et TA et d'*E. faecalis* SAL1.

L'analyse par spectrométrie de masse ESI-Q-TOF des quatre peptides antimicrobiens obtenus a permis de confirmer leur pureté et de déterminer leurs masses moléculaires (tableau 15) après déconvolution des spectres obtenus (figure 17).

Tableau 15. Masses moléculaires de la pédiocine PA-1 correspondant aux des peptides purifiés A4, T4, E16 et SAL1, mesurées par le spectromètre de masse ESI-Q-TOF.

Peptide purifié	Masse moléculaire mesurée (Da)	Bactériocine identifiée
A4	4621,32	pédiocine PA-1
T4	4621,23	pédiocine PA-1
E16	4621,32	pédiocine PA-1
SAL1	4621,32	pédiocine PA-1

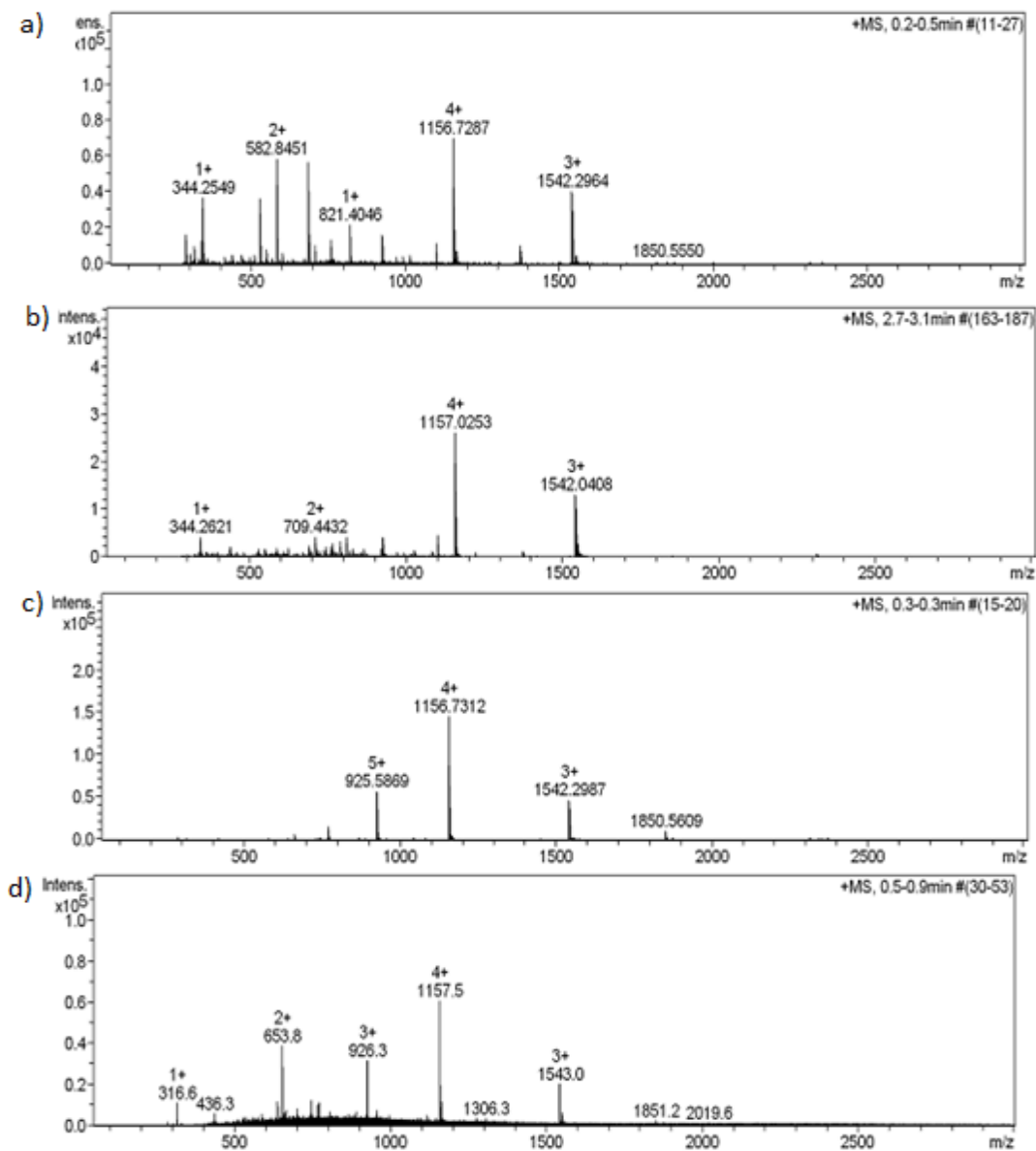


Figure 18. Spectres de masses réalisés par ESI-Q-TOF de la pédiocine PA-1 purifiée à partir de: a) *E. durans* A4; b) *E. durans* T4 ; c) *E. faecium* E16 ; d) par *E. faecalis* SAL1.

Les peptides ainsi purifiés ont par la suite été digérés par de la trypsine, puis soumis à une fragmentation par Nano LC-MS/MS, permettant de déterminer des séquences de 44 acides aminés (tableau 16) avec un taux de recouvrement de 99%.

Ainsi, au vu des masses moléculaires et des séquences peptidiques obtenues, les quatre espèces d'*E. durans* A4 et T4, d'*E. faecium* E16 et d'*E. faecalis* produisent en effet de la pédiocine PA-1.

Tableau 16. Séquence d'acides aminés de la pédiocine PA-1 (peptides A4, T4, E16 et SAL1) analysée par nano LC-MS/MS suite à une digestion trypsique, et identifiée par recherche Mascot sur la base de données NCBIInr.

Peptide	Séquence d'acides aminés	Bactériocine identifiée
A4	KYYGNGVTCGKHSCSVDWVGKATTCIINNGAMAWATGGHQGNHKC	Pédiocine PA-1
T4	KYYGNGVTCGKHSCSVDWVGKATTCIINNGAMAWATGGHQGNHKC	Pédiocine PA-1
E16	KYYGNGVTCGKHSCSVDWVGKATTCIINNGAMAWATGGHQGNHKC	Pédiocine PA-1
SAL1	KYYGNGVTCGKHSCSVDWVGKATTCIINNGAMAWATGGHQGNHKC	Pédiocine PA-1

Par ailleurs, la recherche par PCR de gènes codant pour d'autres bactériocines connues (entéroline AS-48 ; entéroline A, B et P ; entéroline L50 A et B ; entéroline 1071 et nisine) et dont les amorces spécifiques sont disponibles, a montré la présence, chez *E. durans* A4, du gène de l'entéroline P, chez *E. durans* T4, des gènes des entéroline A et P et chez *E. faecalis* SAL1, du gène de l'entéroline AS-48. Ceci, bien qu'aucune fraction correspondant à ces bactériocines n'ait été détectée au cours des différentes étapes de purification.

2.2. *E. faecalis* CAN1

La souche *E. faecalis* CAN1 a été isolée à partir du fromage Cantal AOP à base de lait cru. Le spectre d'activité de l'extrait brut de la culture cellulaire s'étend à plusieurs espèces cibles. La sensibilité de la souche E16 à la (ou aux) bactériocine(s) produite(s) par la souche *E. faecalis* CAN1 suggère que cette dernière produit d'autres bactériocines que la pédiocine PA-1. La souche *L. sakei* ssp. *sakei* ATCC 15521 a été choisie comme souche indicatrice. L'activité antimicrobienne des fractions collectées à la sortie de la colonne échangeuse de cation à pH 6,0 a été étalée sur une large gamme des fractions, de 5 à 32 (fraction II).

Le chromatogramme obtenu après injection de la fraction II dans la colonne C8 semi-préparative montée sur une chaîne HPLC est représenté sur la figure 18. Il montre un très large pic correspondant probablement aux bactériocines ainsi qu'à des impuretés. Il montre également de petits pics correspondant aux fractions 49, 50 et 51, récoltées juste après.

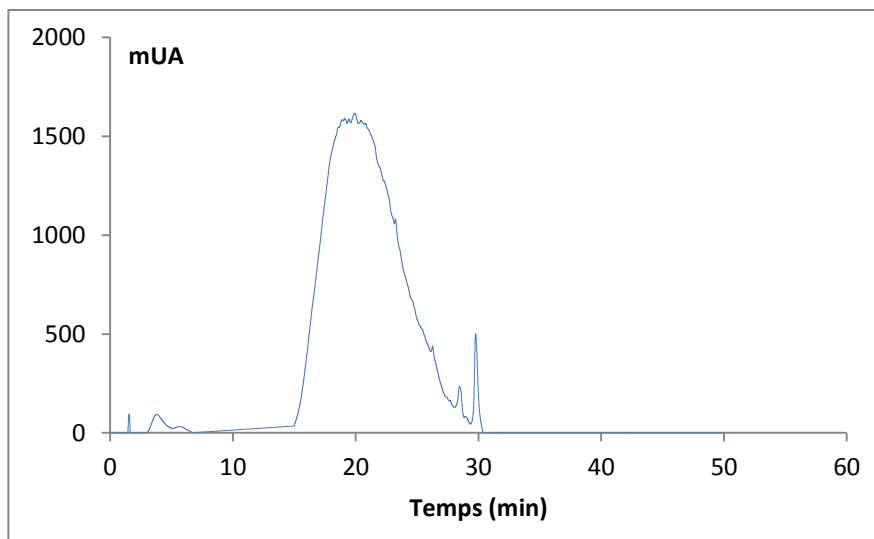


Figure 19. Profil chromatographique à 280 nm après séparation sur colonne C8 semi-préparative de la fraction II d'*E. faecalis* CAN1 avec un gradient linéaire de 0 à 90% d'acétonitrile à 0,1% de TFA dans de l'eau à 0,1% de TFA en 54 min.

L'activité antimicrobienne testée par la méthode des spots a été détectée dans toutes les fractions collectées de 5 à 50 min. Dans ces conditions, il est difficile de repérer les pics correspondant aux fractions actives. On distingue néanmoins deux groupes de fractions actives : le groupe 1, allant de la fraction 30 à la fraction 45 (temps de rétention 20 min à 27,5 min) et le groupe 2, allant de la fraction 46 à la fraction 58 (temps de rétention 28 min à 34 min). Dans le groupe 1, les zones d'inhibition avec un diamètre maximal ont été détectées dans les fractions 39 (15 mm) et 40 (16 mm). Dans le groupe 2, la plus grande zone d'inhibition a été détectée dans la fraction 54 (17 mm), qui correspond à un pic bien distinct (temps de rétention 32 min). Cette dernière nommée CAN1E a été purifiée, par injection dans la colonne C18 analytique montée sur la même chaîne HPLC. Le chromatogramme obtenu (figure 19) comprend un seul pic bien isolé et présentant une pureté suffisante pour l'analyse de masse.

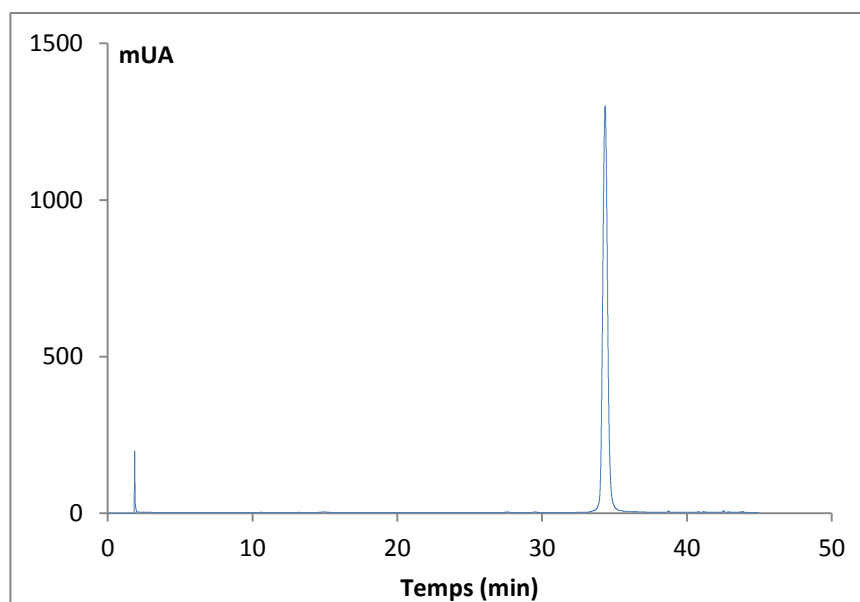


Figure 20. Profil chromatographique à 280 nm après séparation sur colonne C18 analytique de la bactériocine CAN1E avec un gradient linéaire de de 20 à 50% d'acétonitrile à 0,1% de TFA en 30 min, de 50 à 100% en 10 min et 100% en 5 min.

La poursuite de la purification des bactériocines du groupe 1 a été impossible en raison de la présence de plusieurs contaminants. Une purification à partir d'une nouvelle culture d'*E. faecalis* CAN1 a été effectuée en équilibrant la colonne échangeuse de cations à pH 7,5. Le filtrat récupéré à la sortie de la colonne a montré une activité importante (800 UA/ml). Il a donc été réinjecté dans la même colonne et au même pH, le deuxième filtrat obtenu a montré à son tour, une activité de 200 UA/ml. Un dernier passage à travers la même colonne à un pH 6,5 a été effectué et le filtrat obtenu n'a pas montré d'activité significative. Les fractions actives éluées lors des trois passages dans la colonne à des pHs différents sont réunies en une seule fraction, c'est la fraction II. Le chromatogramme obtenu (figure 20) après injection de la fraction II dans la colonne C8 semi-préparative montée sur une chaîne HPLC montre un meilleur profil que celui obtenu lors de la première purification (figure 18) avec des pics bien distincts.

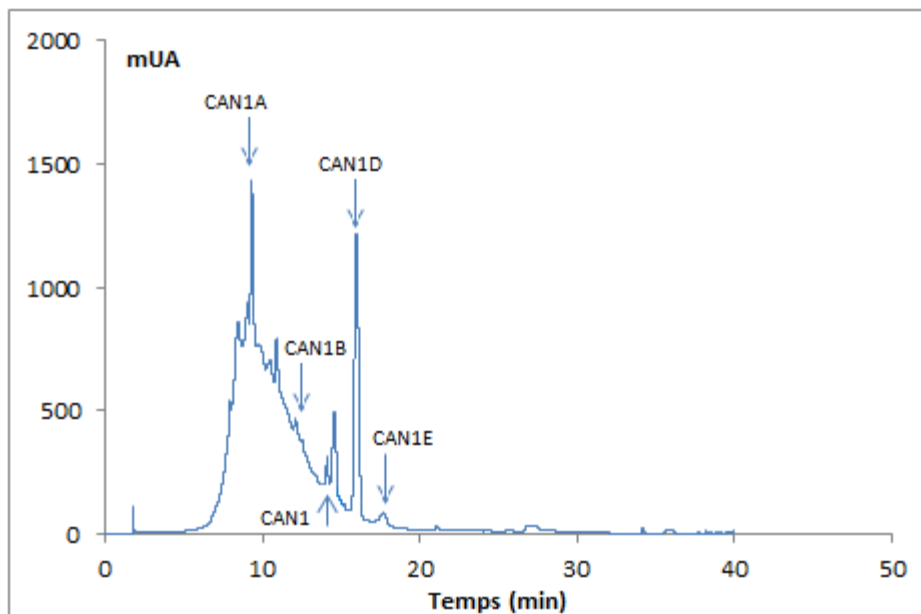


Figure 21. Profil chromatographique à 280 nm après séparation sur colonne C8 semi-préparative de la fraction II d'*E. faecalis* CAN1 avec un gradient linéaire de 0 à 90% d'acétonitrile à 0,1% de TFA dans de l'eau à 0,1% de TFA en 54 min.

Toutes les fractions collectées sont testées par la technique des spots, et l'activité a été détectée de la fraction 8 jusqu'à la fraction 28 (temps de rétention de 8,5 min à 19 min). On a observé trois groupes de fractions actives, chacun ayant une fraction avec une activité antimicrobienne maximale, soit respectivement les fractions 15 (19 mm, CAN1B), 23 (12 mm, CAN1D) et 26 (17mm, CAN1E). Les trois fractions CAN1B, CAN1D et CAN1E ont été diluées dans de l'eau contenant 0,1% de TFA et re-chromatographiées sur la colonne C18 analytique pour une purification finale. Les chromatogrammes obtenus (figure 21) montrent des pics purs et actifs pouvant être analysés par l'ESI-Q-TOF. La fraction CAN1E correspond à la bactériocine précédemment purifiée (figure 19).

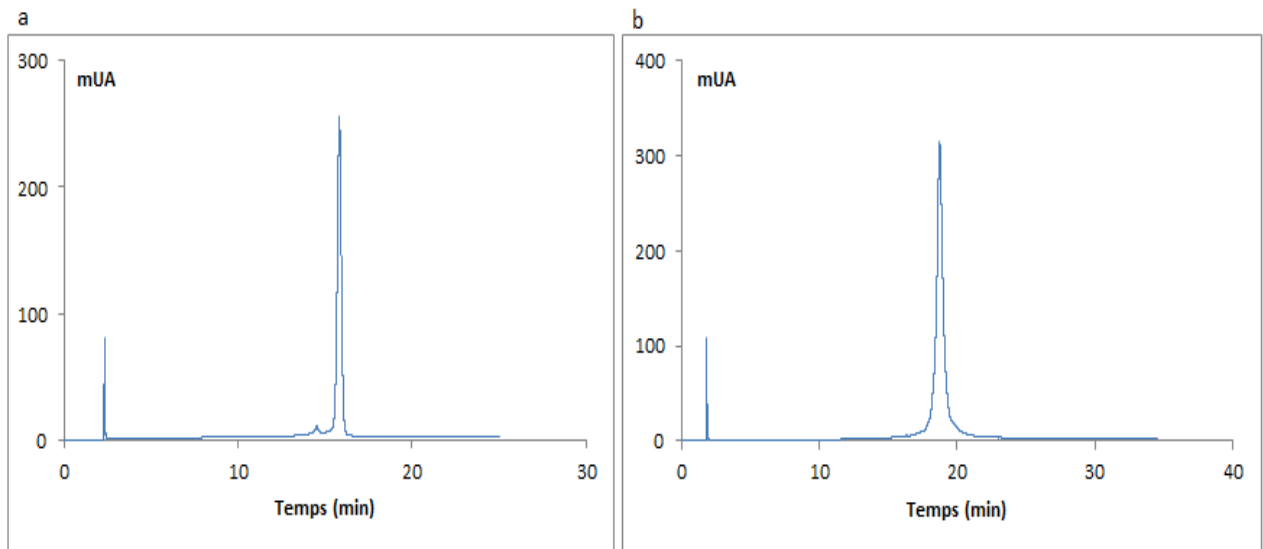


Figure 22. Profil chromatographique à 280 nm après séparation sur colonne C18 analytique des bactériocines, a)CAN1B, b) CAN1D, avec un gradient linéaire de de 20 à 50% d'acétonitrile à 0,1% de TFA en 30 min, de 50 à 100% en 10 min et 100% en 5 min.

Les fractions correspondant aux pics CAN1A et CAN1C (Figure 18), bien que présentant de faibles activités (zone trouble de 5 mm) ont été re-chromatographiées sur la même colonne C18 analytique après leur dilution dans de l'eau ultra-pure contenant 0,1% de TFA. Toutes les fractions collectées ont été testées par la méthode des spots mais aucune activité importante n'a été observée. La faible activité détectée au préalable est probablement due aux fractions périphériques actives des trois peptides purifiés (CAN1B, CAN1D et CAN1E).

L'analyse par spectrométrie de masse ESI-Q-TOF des trois peptides antimicrobiens CAN1B, CAN1D et CAN1E purifiés a permis la mesure de leurs masses moléculaires moyennes après déconvolution des spectres obtenus (figure 22).

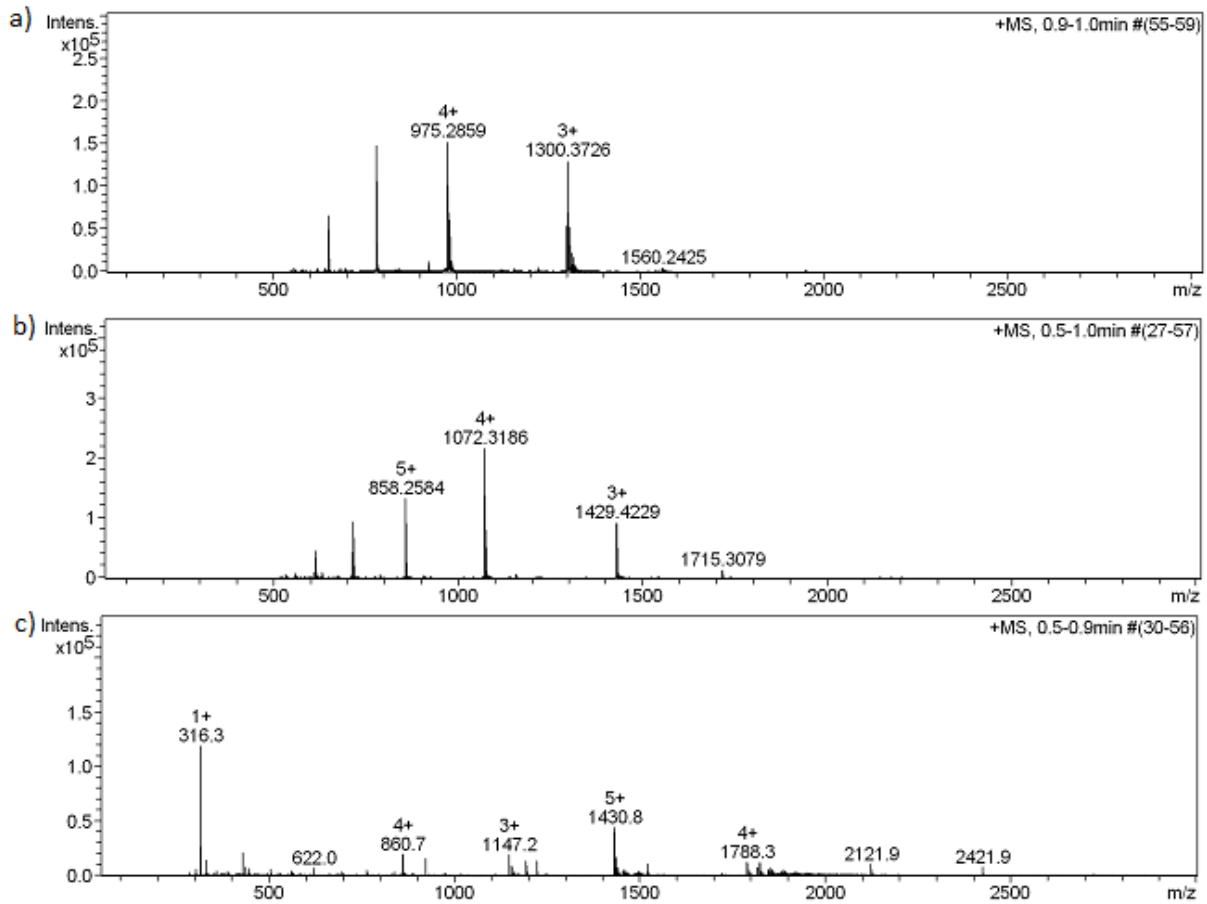


Figure 23. Spectres de masses réalisés par ESI-Q-TOF des bactériocines produites par *E. faecalis* CAN1. a) bactériocine CAN1B ; b) bactériocine CAN1D ; c) bactériocine CAN1E.

Les trois masses moléculaires obtenues (tableau 17) ont été comparées avec celles déjà répertoriées dans la littérature. Les masses moléculaires des peptides CAN1B et CAN1D sont respectivement identiques à celles des entérocinines 1071B et 1071A, les deux peptides constituant l'entérocinine 1071 (Balla et al., 2000 ; Maldonado-Barragán *et al.*, 2009). La masse du peptide CAN1E correspond, quant à elle, à celle de l'entérocinine AS-48 (Montalban-Lopez *et al.*, 2008).

La recherche par PCR de gènes codant pour ces deux bactériocines (entérocinine 1071 et entérocinine AS-48) chez la souche *E. faecalis* CAN1, a également montré leur présence. Ces résultats confirment l'exactitude des comparaisons des masses mesurées de nos bactériocines avec celles de la littérature.

Tableau 17. Masses moléculaires de l'entérocin 1071A (peptide CAN1D), de l'entérocin 1071B (peptide CAN1B) et de l'entérocin AS-48 (peptide CAN1E) mesurées par ESI-Q-TOF.

Peptide purifié	Masse moléculaire (Da)	Bactériocine identifiée
CAN1B	3896,12	Entérocin 1071B
CAN1D	4285,20	Entérocin 1071A
CAN1E	7148,06	Entérocin AS-48

Par ailleurs, la détermination de la séquence en acides aminés du peptide CAN1D a été réalisée en soumettant ce dernier à la dégradation d'Edman sur un séquenceur de protéine Applied Biosystems modèle 492. L'analyse de la séquence obtenue avec le système d'analyse des données Applied Biosystems (software Procise PC v2.1) a permis l'identification d'une séquence de 39 acides aminés correspondant bien à l'entérocin 1071A (tableau 18).

Les résultats obtenus pour les peptides CAN1B et CAN1D, d'abord par spectrométrie de masse, ensuite par séquençage des déterminants génétiques et enfin par dégradation d'Edman (CAN1D), permet de conclure qu'il s'agit bien des deux peptides constituant l'entérocin 1071.

Tableau 18. Séquence d'acide aminé de l'entérocin 1071A issue après dégradation d'Edman et de l'entérocin 1071B et l'entérocin AS-48 déduit de la bibliographie.

Peptide	Séquence en acides aminés	Technique utilisée	Bactériocine correspondante
CAN1D	ESVFSKIGNAVGPAAYWILKGLGNMSDVNQADRINRKKH	Séquençage d'Edman	Entérocin 1071A
CAN1B	GPGKWLPWLQPAYDFVTGLAKGIGKEGKNKWKNV	PCR du gène de structure	Entérocin 1071B
CAN1E	MAKEFGIPAAVAGTVLNVVEAGGWVTTIVSILTAVGSGG-LSLLAAAGRESIKAYLKKEIKKKGKRAVIAW	PCR du gène de structure	Entérocin AS-48

2.3. *E. faecium* E14

La souche *E. faecium* E14 a été isolée à partir d'échantillons de fromage de type Reblochon Fruitier à base de lait cru et son activité antimicrobienne au cours des différentes étapes de purification a été évaluée en utilisant la souche *E. raffinosus* E26 comme souche indicatrice. Sa sensibilité à l'extrait de culture brut de la souche *E. faecalis* CAN1, signifie qu'elle produit d'autres bactériocines que la AS-48 et l'entérocin 1071 produites toutes les deux par la souche *E. faecalis* CAN1.

L'extrait brut de la culture d'*E. faecium* E14 a été soumis au même protocole de purification que dans les autres cas cités précédemment, avec un échange de cations effectué à pH 6,4. Les pics chromatographiques obtenus après séparation sur C18 analytique sont très

larges et chargés d'impuretés, ce qui empêche leur identification. Une purification à partir d'une nouvelle culture d'*E. faecium* E14 a été effectuée en augmentant le pH du tampon d'équilibrage de la colonne échangeuse de cations à 7,5. Le test d'activité, par la méthode des spots, des fractions collectées après l'éluion a révélé l'activité antimicrobienne de 31 fractions (de 1 au 31). Le filtrat récupéré très actif (1600 UA/ml) a été réinjecté dans la même colonne à pH 7,0 et 31 fractions actives ont été récupérées avec un filtrat inactif. Les fractions 9 et 15, avec les zones d'inhibition maximales respectivement 15 et 12 mm, obtenues lors des deux purifications (à pH 7, 5 et pH 7,0) ont été réunies (fraction II).

Celle-ci a été séparée sur la colonne C8 semi-préparative. Quatre fractions E14A, E14B, E14C, et E14D, recueillies à différents temps de rétention ont montré une activité antimicrobienne avec la technique des spots. Chaque fraction a été diluée dans de l'eau ultra-pure contenant 0,1% de TFA et individuellement séparée sur la colonne C18 analytique. Les chromatogrammes obtenus ont révélé un seul pic actif avec un temps de rétention de 22 min pour le peptide E14A, 25 min pour le peptide E14B, 29 min pour le peptide E14C et 31,5 min pour le peptide E14D. Toutefois, les deux peptides E14B et E14C n'ont pu être suffisamment résolus, malgré plusieurs chromatographies successives.

L'analyse par spectrométrie de masse ESI-Q-TOF des peptides E14A et E14D a permis de confirmer leurs pureté et de déterminer leurs masses moléculaires, soit 4621,20 Da pour le peptide E14A et 5459,68 Da pour le peptide E14D (figure 23).

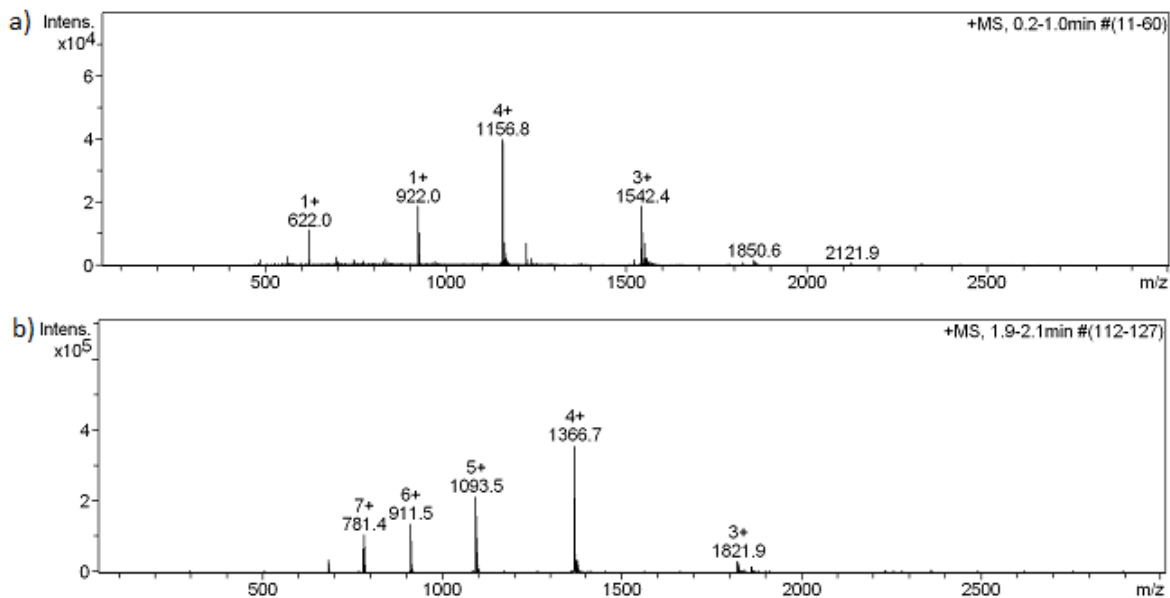


Figure 24. Spectres de masses réalisés par l'ESI-Q-TOF des bactériocines produites par *E. faecium* E14.a) bactériocine E14A; b) bactériocine E14D.

Le peptide E14A ainsi purifié a par la suite été digéré par de la trypsine, puis soumis à une fragmentation par Nano LC-MS/MS. La comparaison des séquences obtenues avec la base

de donnée NCBIInr, a permis de déterminer une séquence de 44 acides aminés (tableau 19) correspondant à la pédiocine PA-1 avec un taux de recouvrement de 99%.

Pour le peptide E14D, la comparaison de sa masse moléculaire, 5461,21 Da avec celles répertoriées dans la littérature a permis son identification comme étant l'entéroccine B (Hu *et al.*, 2008 ; Hu *et al.*, 2010)

Tableau 19. Séquence d'acides aminés de la pédiocine PA-1 (peptide E14A) issue de la digestion trypsique, analysée par nano LC-MS/MS et identifiée par recherche Mascot sur la base de données NCBIInr.

Peptide	Séquence peptidique	Bactériocine
E14A	KYYGNGVTCGKHSCSVDWKGATTCIINNGAMAWATGGHQGNHKC	Pédiocine PA-1
E14D	ENDHRMPNELNRPNNLSKGGACGAAIAGGLFGIPKGPLAWAAGLANVYSKCN	Entéroccine B

Par ailleurs, la recherche par PCR de gènes codant pour d'autres bactériocines connues (entéroccine AS-48 ; entéroccines A, B et P ; entéroccines L50A et B ; entéroccine 1071 et nisine) et dont les amorces spécifiques sont disponibles, a montré la présence chez la souche *E. faecium* E14, des gènes des entéroccines A, B et P. Ceci confirme que le peptide E14D est bien l'entéroccine B, et suggère par ailleurs que pour les deux autres peptides E14B et E14C non purifiés, il pourrait s'agir des entéroccines A et P (Aymerich *et al.*, 1996 ; Cintas *et al.*, 1997).

3. Bactériocines de genre *Lactobacillus*

3.1. *L. plantarum* B, C et LS3

Les souches de *L. plantarum* B, C et LS3 ont été isolées respectivement du Beurre, Smen et Lben, produits fermentés traditionnels. Les spectres d'activités de leurs extraits bruts sont très similaires, et ils s'étendent à plusieurs espèces cibles. La souche *E. faecalis* WHE 96 a été retenue pour tester leurs activités antimicrobiennes au cours des différentes étapes de purification.

Pour chaque culture, l'extrait brut préparé a été concentré par chromatographie flash sur colonne C18 et les fractions actives recueillies ont été passées sur la colonne échangeuse de cations à un pH de 6,4. Pour chaque souche, un seul lot de fractions a été retenu (de 11 au 27), avec une activité maximale (zone d'inhibition majeure de 19 mm) détectée dans les fractions centrales 15 et 16 (fraction II).

Après injection de la fraction II sur la colonne C8 semi-préparative, les fractions éluées ont été collectées puis testées par la technique des spots. La fraction correspondant à l'unique pic du chromatogramme, à un temps de rétention 22 min, coïncide avec l'activité

antimicrobienne maximale chez les trois *L. plantarum* B, C et LS3. Elle a été diluée dans de l'eau ultra-pure contenant 0,1% de TFA et re-chromatographiée sur une colonne C18 analytique montée sur la même chaîne HPLC afin d'isoler les peptides B, C et LS3 purs. Le pic obtenu est bien isolé et correspond à un temps de rétention de 22 min. La fraction active récupérée (figure 24) a servi pour l'analyse par ESI-Q-TOF.

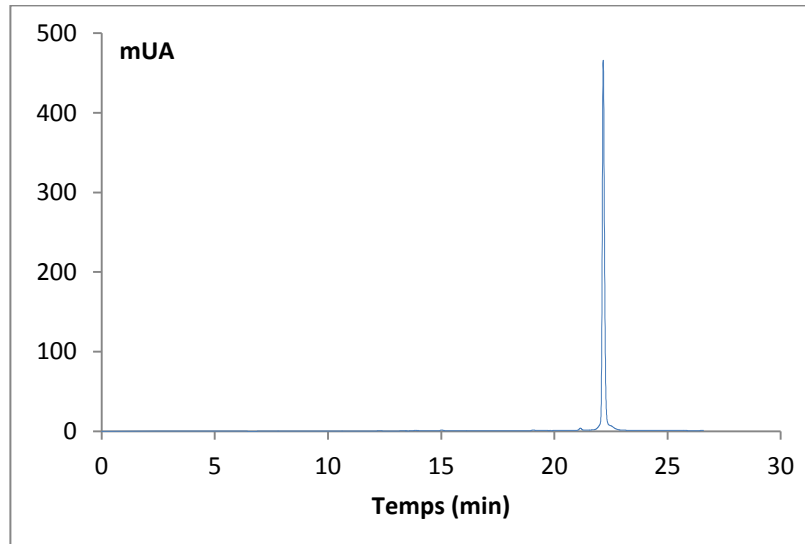


Figure 25. Profil chromatographique à 280 nm après séparation sur colonne C18 analytique de la fraction III de *L. plantarum* C avec un gradient linéaire de de 20 à 50% d'acétonitrile à 0,1% de TFA en 30 min, de 50 à 100% en 10 min et 100% en 5 min.

La spectrométrie de masse ESI-Q-TOF des peptides B, C et LS3 obtenus a permis de confirmer leur pureté et de déterminer leurs masses moléculaires (tableau 20), après déconvolution des spectres obtenus (figure 25).

Tableau 20. Masses moléculaires de la pédiocine PA-1 (peptides B, C et LS3) mesurées par le spectromètre de masse ESI-Q-TOF.

Peptide purifié	Masse moléculaire (Da)	Bactériocine correspondant
B	4621,31	Pédiocine PA-1
C	4621,33	Pédiocine PA-1
LS3	4621,32	Pédiocine PA-1

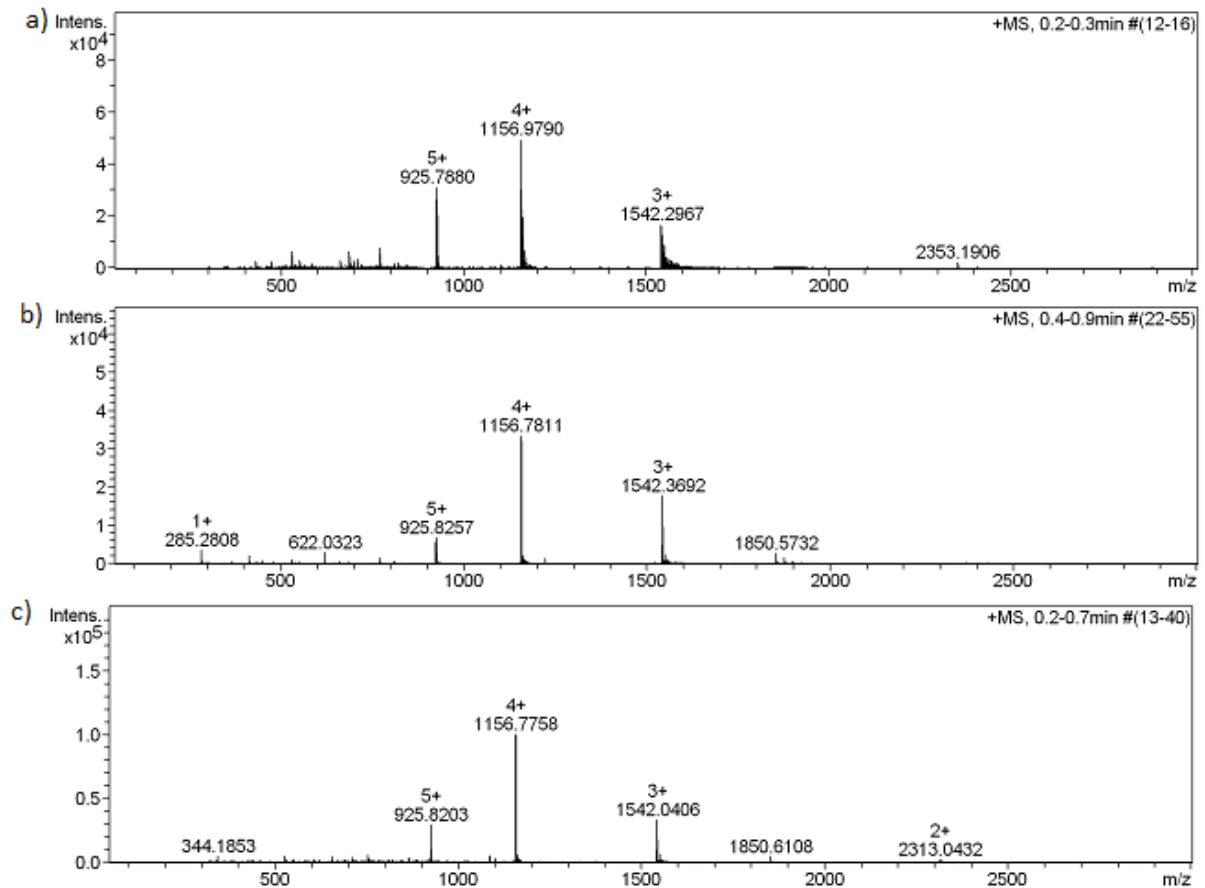


Figure 26. Spectres de masses réalisés par l'ESI-Q-TOF des peptides B, C et LS3 produits par :a) *L. plantarum* B; b) *L. plantarum* C; c) produit *L. plantarum* LS3.

Les peptides ainsi purifiés ont par la suite été digérés par de la trypsine, puis soumis à une fragmentation par Nano LC-MS/MS. Une recherche Mascot sur la base de données NCBIInr, a permis de déterminer la séquence peptidique de 44 acides, correspondant à la pédiocine PA-1 (tableau 21).

Tableau 21. Séquences d'acides aminés de la pédiocines PA-1 (peptides B, C et LS3), issues de la digestion trypsique, analysés par nano LC-MS/MS et identifiée par recherche Mascot sur la base de données NCBIInr.

Peptide	Séquence peptidique	Bactériocine correspondant
B	KYYGNGVTCGKHSCSVDWGKATTCIINNGAMAWATGGHQGNHKC	Pédiocine PA-1
C	KYYGNGVTCGKHSCSVDWGKATTCIINNGAMAWATGGHQGNHKC	Pédiocine PA-1
LS3	KYYGNGVTCGKHSCSVDWGKATTCIINNGAMAWATGGHQGNHKC	Pédiocine PA-1

3.2. *L. plantarum* MJP1

La souche *L. plantarum* MJP1 a été isolée à partir d'échantillons de fromage de type Morbier à base de lait cru. En se basant sur le spectre d'activité de son extrait brut, la souche *L.*

sakei ssp. sakei ATCC 15521 a été retenue pour tester son activité antimicrobienne au cours des différentes étapes de purification.

L'extrait brut préparé a été soumis au même protocole de purification que dans les autres cas cités précédemment, avec un échange de cations effectué à pH 6,5. Les fractions montrant une activité maximale (zones d'inhibition importantes) ont été réunies en une seule fraction (fraction II). Après chromatographie en phase inverse semi-préparative, deux fractions actives MJPIA et MJPIB avec des temps de rétention respectivement de 8,6 min et 14,7 min ont été détectées. Elles sont diluées dans de l'eau ultra-pure contenant 0,1% de TFA et purifiées sur la colonne C18 analytique.

L'analyse par spectrométrie de masse ESI-Q-TOF des peptides purifiés MJPIA et MJPIB a permis de déterminer leurs masses moléculaires respectives, soit 3928,74 Da et 7145,09 Da après déconvolution des spectres obtenus (figure 26).

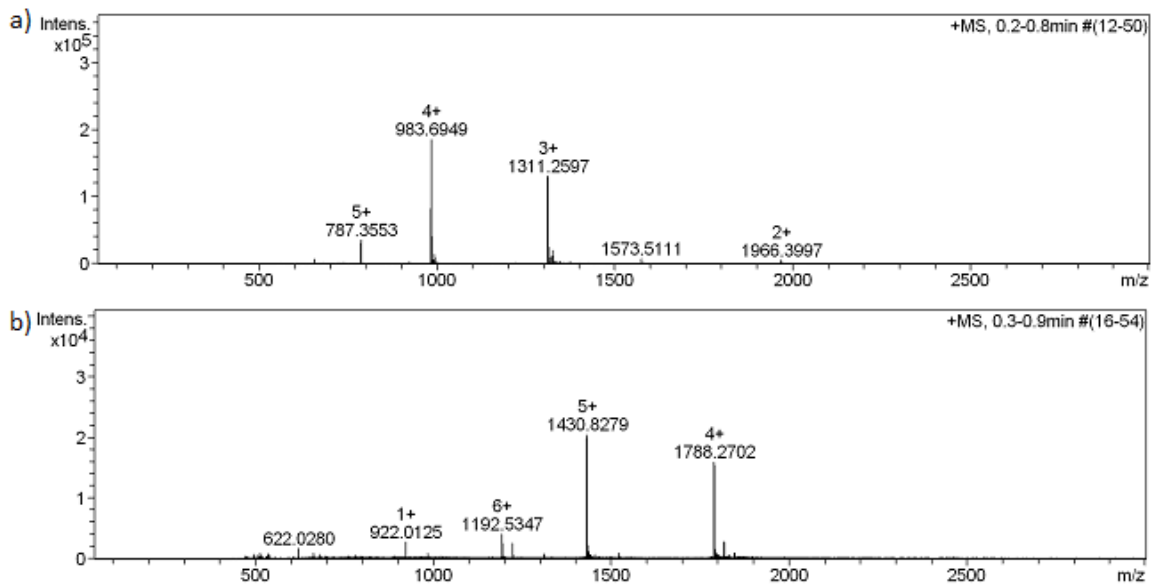


Figure 27. Spectres de masses réalisés par l'ESI-Q-TOF des bactériocines produits par *L. plantarum*. a) MJPIA ; b) MJPIB.

Le peptide MJPIA ainsi purifié a par la suite subi une dégradation d'Edman sur un séquenceur de protéine Applied Biosystems modèle 492. L'analyse de la séquence obtenue avec le système d'analyse de données Applied Biosystems (software Procise PC v2.1) a permis l'identification d'une séquence d'acides aminés très proche de celle de la plantaricine 423 (Van Reenen, *et al.*, 2003). Mais, quelques différences ont été détectées entre les deux séquences (Tableau 13). Les cysteines (C) en position 14 et 37 de la Plantaricine 423 ont été substituées au niveau du peptide MJPIA respectivement par la Tyrosine (Y) et par soit l'Arginine (R), soit

la Tyrosine (Y). La présence de ces deux derniers acides aminés (R/Y) n'est pas sûre puisqu'il s'agit de la fin de la séquence où le séquençage est moins précis. De plus, la dernière séquence d'acides aminés, Serine (S), Valine (V), Asparagine (N) et Valine (V) est absente chez la plantaricine 423 (tableau 22).

Pour obtenir plus de données sur la structure du peptide MJPIA et vérifier cette séquence déterminée par la dégradation d'Edman, une analyse par la nano-LC-MS/MS après digestion trypsique a été réalisée. Une séquence identique à celle de la plantaricine 423 a pu être déterminée (tableau 13). La structure du peptide MJPIA n'est à ce jour pas encore connue avec certitude. Une digestion trypsique avec séquençage d'Edman des fragments obtenus devrait permettre de s'assurer de la structure de ce peptide.

Tableau 22. Séquence d'acides aminés de la plantaricine 423 (peptide MJPIA) issue de la digestion trypsique, analysée par nano LC-MS/MS et identifiée par recherche Mascot sur la base de données NCBI et de la dégradation d'Edman. En rouge les différences avec la séquence de la plantaricine 423 répertorié dans la littérature.

Bactériocine	Séquence peptidique	Technique d'identification
MJPIA	KYYGNGVTCGKHS Y SVNWGQAFSCSVSHLANF Y GHGK(R/Y)SVNV YYGNGVTCGKHSCSVNWGQAFSCSVSHLANF Y GHGK	Dégradation d'Edman Spectrométrie de masse
*Plantaricine 423	KYYGNGVTCGKHS C SVNWGQAFSCSVSHLANF C GHGK	Dégradation d'Edman

* séquence purifiée par Van Reenen *et al.*,(2003)

Concernant le peptide MJPIB, la comparaison de sa masse moléculaire (7145,09 Da), avec les données de la littérature, a permis son identification comme étant l'entérocoque AS-48.

3.3. *L. paracasei* GRU3

La souche *L. paracasei* GRU3 a été isolée à partir d'échantillons de fromage de type Gruyère Bio AOP. A partir du spectre d'activité de son extrait brut, la souche *L. sakei* ssp. *sakei* ATCC 15521 a été utilisée comme souche indicatrice.

L'extrait brut préparé a été soumis au même protocole de purification que dans les autres cas cités précédemment, avec un échange de cations effectué à pH 6,0. Les fractions éluées, ont été injectées dans la colonne C18 semi-préparative montée sur une chaîne HPLC. Les fractions correspondant aux pics GRU3A, GRU3B, GRU3C et GRU3D ont présenté des activités maximales (respectivement 15, 13, 13 et 14 mm) par le test des spots. Elles ont été purifiées par des injections successives sur la colonne C18 analytique jusqu'à obtention de la pureté suffisante pour une analyse par l'ESI-Q-TOF.

Les masses moléculaires moyennes obtenues (figure 27) des quatre peptides sont présentées au tableau 23.

Tableau 23. Masses moléculaires des peptides GRU3A, GRU3B, GRU3C et GRU3D mesurées par le spectromètre de masse ESI-Q-TOF.

Peptide	Masse moléculaire (Da)
GRU3A	4621
GRU3B	7147,06
GRU3C	5461,97
GRU3D	5369,57

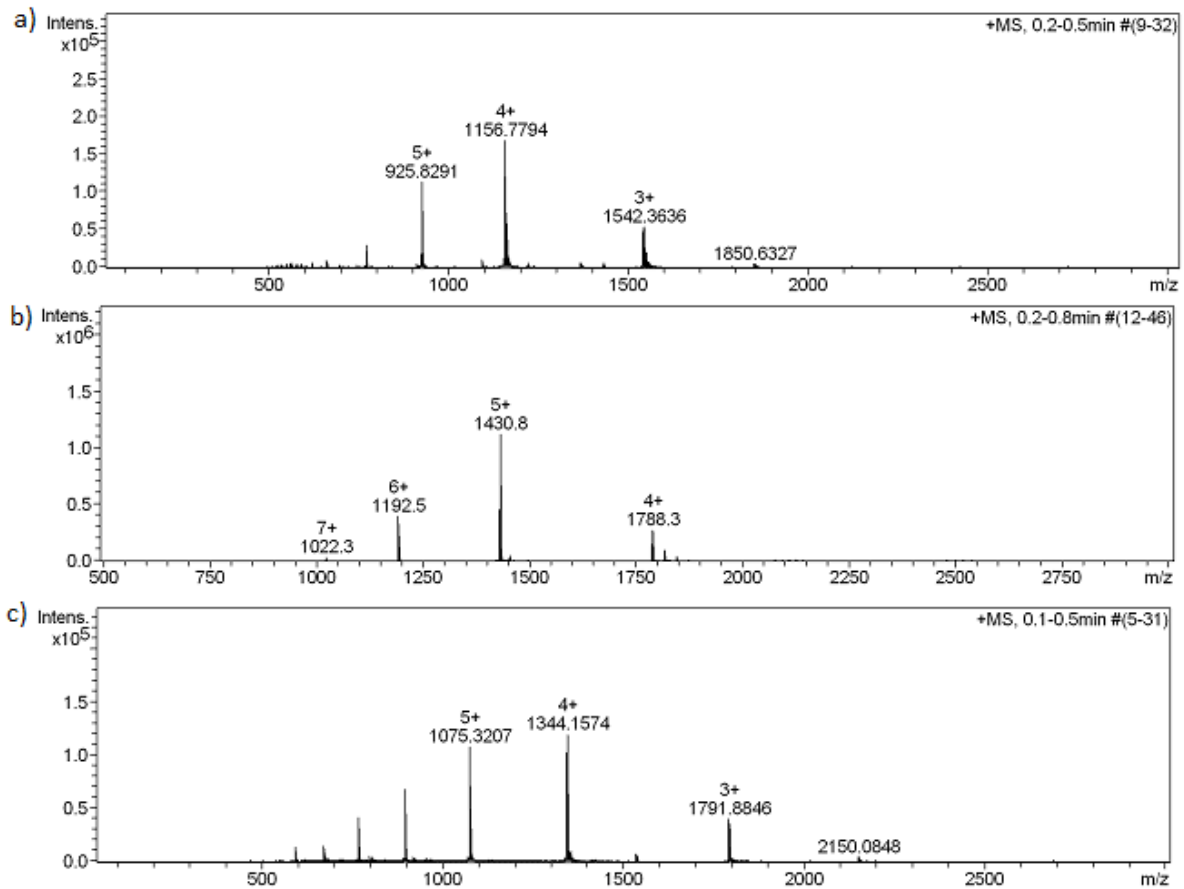


Figure 28. Spectres de masses réalisés par l'ESI-Q-TOF des bactériocines produites par *L. paracasei* GRU3.a) GRU3A; b) GRU3B ; c) GRU3D.

Les peptides GRU3A et GRU3D ainsi purifiés ont été digérés par de la trypsine, puis soumis à une fragmentation par Nano LC-MS/MS, permettant de déterminer leurs séquences en acides aminés (tableau 14). La comparaison des séquences obtenues avec celles de la base de données NCBI, ainsi que les résultats des masses obtenues, permettent d'identifier le peptide GRU3A comme étant la pédiocine PA-1 et le peptide GRU3D comme étant la bactériocine BacSJ2-8 (Kojic *et al.*, 2010).

Tableau 24. Séquences d'acides aminés de la pédiocine PA-1 (peptide GRU3A) et de la bactériocine BacSJ2-8 (peptide GRU3D) issues de la digestion trypsique, analysées par nano LC-MS/MS et identifiées recherche Mascot sur la base de données.

Peptide	Séquence peptidique	Bactériocine
GRU3A	KYYGNGVTCGKHSCSVDWGKATTTCIINNGAMAWATGGHQGNHKC	Pédiocine PA-1
GRU3D	YSYFGSNGYSWRDKRGHWHTVTKGGFETVIGIIGDVGWGSAGAPGPGQH	BacSJ2-8

Concernant les deux autres peptides GRU3B et GRU3C, la comparaison de leurs masses moléculaires respectives (7147,06 Da et 5461,97 Da), avec les données de la littérature ont permis leur identification comme étant l'entéroisine AS-48 et l'entéroisine B.

4. Bactériocines de genre *Pediococcus*

4.1. *P. acidilactici* BAA2, CAN2, OIF3, P1 et SNF1

Les souches de *P. acidilactici* BAA2, CAN2, OIF3, P1 et SNF1 ont été isolées respectivement à partir d'échantillons de fromage : Brie de Meaux, Cantal AOP, Ossau Iraty, Reblochon de Savoie Pochat et Saint Nectaire, tous à base de lait cru de vache. Le spectre d'activité de leurs extraits bruts s'étend à plusieurs espèces cibles. Des souches indicatrices ont été retenues pour tester leurs activités antimicrobiennes au cours des différentes étapes de purification (tableau 25)

Tableau 25. Souches indicatrices choisies pour tester l'activité antimicrobienne par la technique des spots pour les souches *Pediococcus acidilactici* CAN2, P1, BAA2, OIF3 et SNF1.

Souche productrice	Souche indicatrice
<i>P. acidilactici</i> CAN2	<i>L. sakei</i> subsp. <i>sakei</i> ATCC 15521
<i>P. acidilactici</i> P1	<i>E. faecium</i> LC E14
<i>P. acidilactici</i> BAA2, OIF3 et SNF1.	LC X

Pour toutes ces souches, à l'issue de la chromatographie flash en phase inverse, les fractions recueillies ayant montré une activité antimicrobienne sont les fractions de 5 à 31. Ces fractions, réunies (fraction I), ont été passées sur la colonne échangeuse de cations à un pH de 6,4. A la sortie de la colonne, l'activité est détectée sur une large gamme de fractions (de 5 à 31). Celles, centrales (12 et 13), ayant présenté l'activité maximale (19 et 18 mm, respectivement), sont réunies en une seule fraction (fraction II) et passées sur une colonne semi-préparative en phase inverse C8. Les fractions actives recueillies correspondent à des temps de rétention allant de 6,5 à 30 min. L'activité antimicrobienne majeure (22 mm) correspond à un temps de rétention de 9,5 min pour les souches de *P. acidilactici* P1 et CAN2,

et à un temps de rétention de 7,5 min pour les souches de *P. acidilactici* BAA2, OIF3 et SNF1. Ces fractions ont été diluées dans de l'eau ultra-pure contenant 0,1% de TFA et passées sur la colonne C18 analytique afin d'isoler les peptides purs. Un exemple de chromatogrammes obtenus est présenté sur la figure 28.

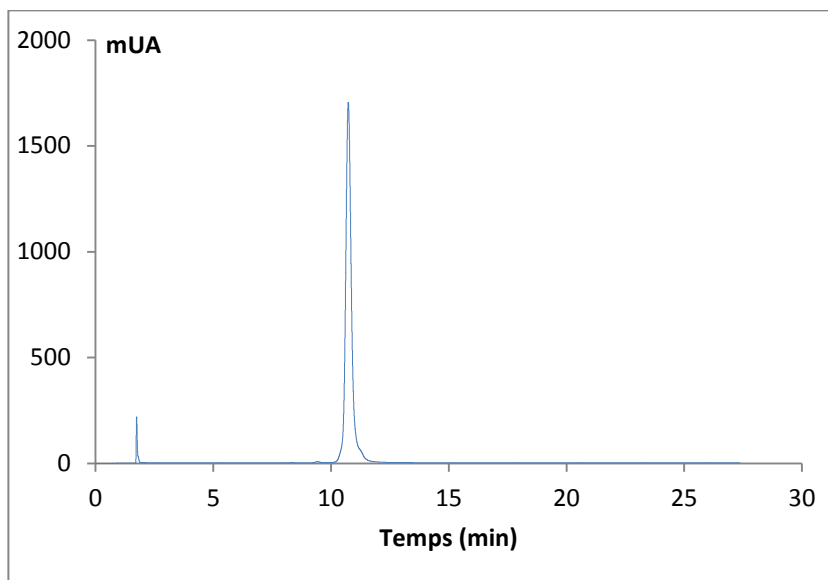


Figure 29. Profil chromatographique à 280 nm après séparation sur colonne C18 analytique de la fraction III de *P. acidilactici* CAN2 avec un gradient linéaire de de 20 à 50% d'acétonitrile à 0,1% de TFA en 30 min, de 50 à 100% en 10 min et 100% en 5 min.

Les masses moléculaires des peptides purs BAA2, CAN2, OIF3, P1 et SNF1, analysés par spectrométrie de masse ESI-Q-TOF sont présentées au tableau 26. La comparaison avec les profils chromatographiques et les masses des bactériocines, précédemment identifiées, ainsi qu'avec les données de la littérature, permet de déduire que les quatre peptides purifiés (BAA2, CAN2, OIF3 et SNF1) correspondent à la pédiocine PA-1. La masse du peptide P1, ayant 16 Da de plus par rapport à celle des autres, une analyse complémentaire s'avère nécessaire pour expliquer cette légère différence (tableau 26).

Tableau 26. Masses moléculaires et identification des peptides BAA2, OIF3, SNF1, CAN2 et P1 mesurées par le spectromètre de masse ESI-Q-TOF.

Peptide	Masse (Da)	Bactériocine identifiée
BAA2	4621,20	pédiocine PA-1
OIF3	4621,20	pédiocine PA-1
SNF1	4621,20	pédiocine PA-1
CAN2	4621,32	pédiocine PA-1
P1	4637,32	pédiocine PA-1-ox

Les profils des spectres de masses du peptide P1 et de la pédiocine PA-1 semblent identiques (figure 29a). Néanmoins, les profils isotopiques des deux peptides (figure 29b) montrent une amplification du signal avant le massif majoritaire (en rouge) pour le peptide P1 et après le massif majoritaire pour la pédiocine PA-1. Ce genre de profil semble indiquer que pour la pédiocine native, la forme oxydée soit en quantité négligeable, alors que le peptide P1 serait une forme majoritairement oxydée de la pédiocine. En effet, l'oxydation des résidus méthionine chez certaines bactériocines, induisant un incrément de masse de 16 Da, a déjà été répertoriée dans la littérature.

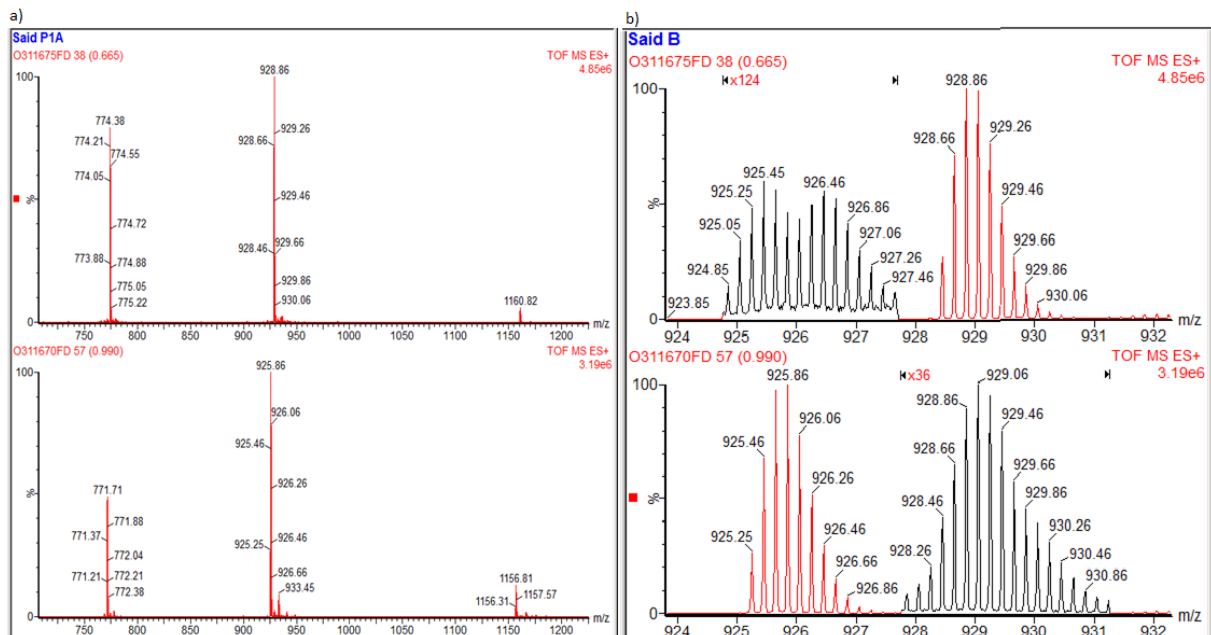


Figure 30. Comparaison des spectres de masses de la pédiocine PA-1: P1 produite par *P. acidilactici* P1 (cette étude) et L3 produite par *L. plantarum* WHE 92, (Ennahar, *et al.*, 1996). a) spectres obtenus ; b) après le zoom sur 5+.

Les peptides ainsi purifiés (BAA2, OIF3, SNF1, CAN2 et P1) ont par la suite été digérés par la trypsine, puis soumis à une fragmentation par Nano LC-MS/MS. La comparaison des séquences obtenues avec celles de la base de données NCBIInr a permis la détermination des séquences en acides aminés des bactériocines (tableau 27). Un pourcentage de recouvrement de 100% a été obtenu pour les quatre bactériocines (BAA2, OIF3, SNF1 et CAN2), alors que pour la bactériocine P1, un faible pourcentage de 30% a été enregistré. La partie C-terminale de cette bactériocine n'avait pas pu être identifiée. La recherche d'ion parent de ce peptide a permis de confirmer qu'il était présent, mais peu intense pour être sélectionné et fragmenté par le spectromètre (figure 30).

Tableau 27. Séquences en acides aminés de la pédiocine PA-1 (peptide BAA2, OIF3, SNF1, CAN2 et P1) issues de la digestion trypsique, analysées par nano LC-MS/MS et identifiées recherche Mascot sur la base de données.

Peptide	Séquence peptidique	Bactériocine
BAA2	KYYGNGVTCGKHSCSVDWVGKATTCIINNGAMAWATGGHQGNHKC	Pédiocine PA-1
OIF3	KYYGNGVTCGKHSCSVDWVGKATTCIINNGAMAWATGGHQGNHKC	Pédiocine PA-1
SNF1	KYYGNGVTCGKHSCSVDWVGKATTCIINNGAMAWATGGHQGNHKC	Pédiocine PA-1
CAN2	KYYGNGVTCGKHSCSVDWVGKATTCIINNGAMAWATGGHQGNHKC	Pédiocine PA-1
P1	KYYGNGVTCGKHSCSVDWVGK ATTCIINNGAMAWATGGHQGNHKC	Pédiocine PA-1-ox

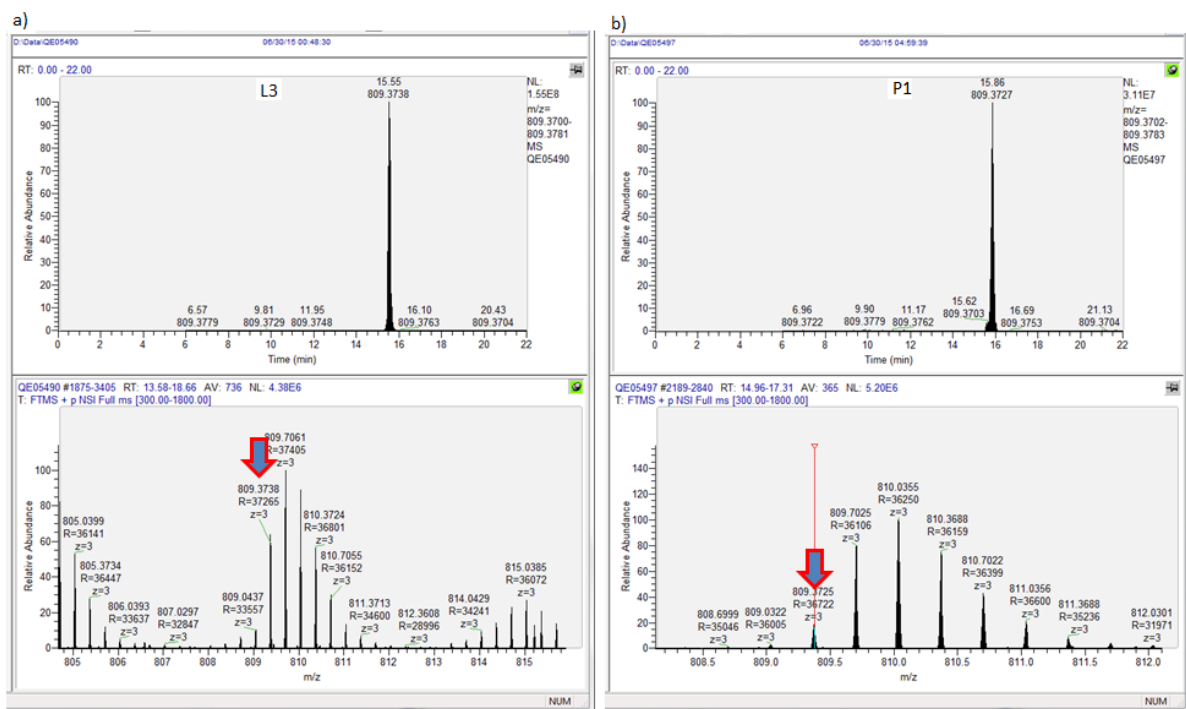


Figure 31. Comparaison des spectres de masses de la recherche d'ion parent de la pédiocine PA-1 produite par a) *L. plantarum* WHE 92 (Ennahar et al., 1996); b) *P. acidilactici* P1 (cette étude).

Cette étude structurale a permis de mettre en évidence 10 bactériocines différentes : maltaricine CPN ; BacSJ2-8 ; plantaricine 423 ; entéroïcine 1071A ; entéroïcine 1071B, entéroïcine A ; entéroïcine B ; entéroïcine P ; entéroïcine AS-48 et pédiocine PA-1 produites par les différentes espèces bactériennes retenues dans ce travail. Certaines espèces sont mono-productrices dans les conditions expérimentales de ce travail (*C. maltaromaticum* CPN1, *E. faecium* E16, *L. plantarum* B, C et LS3, *P. acidilactici* P1 et *P. acidilactici* CAN2, BAA2, OIF3, et SNF1), alors que d'autres sont productrices multiples, avec deux ou plusieurs bactériocines produits (*E. durans* A4 et T4, *E. faecalis* SAL1 et CAN1, *E. faecium* E14, *L. paracasei* GRU3 et *L. plantarum* MJ1).

La majorité des bactériocines ont été identifiées après purification par mesure de la masse par ESI-TOF et analyse de la séquence peptidique, soit par dégradation d'Edman, soit par Nano-LC-MS/MS. Les autres bactériocines ont été détectées par recherche de leurs déterminants génétiques.

5. Pureté et activité antimicrobienne des bactériocines au cours de la purification

Dix-sept souches bactériennes appartenant à 7 espèces différentes (*C. maltaromaticum*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, et *P. acidilactici*) ont révélé une activité antimicrobienne. Les bactériocines ont été purifiées suivant quatre étapes principales : préparation de l'extrait de culture, concentration par chromatographie flash en phase inverse, purification sur colonne échangeuse de cations et isolement du peptide antimicrobien pur par HPLC en phase inverse semi-préparative puis analytique. L'activité antimicrobienne des fractions recueillies après chaque étape de purification est exprimée en UA/ml. Pour chaque fraction, l'activité a été déterminée selon la méthode des dilutions critiques (chapitre 2, I. 3. Matériels et méthodes) et l'absorbance mesurée à 280 nm. L'activité spécifique et le rendement de chaque étape de purification ont ainsi pu être calculés (tableau 29).

En termes de recouvrement, les résultats montrent des pertes à chacune des étapes de purification. Ainsi, pour la pédiocine PA-1 produite par *L. plantarum* C, seuls 64,8% de la quantité totale de bactériocine sont récupérés après l'étape de concentration par chromatographie flash, et seuls 40,5% sont retrouvés après échange de cations. Ces pourcentages sont respectivement de 72% et 12,5% dans le cas des autres bactériocines produites par *E. faecalis* CAN1. Ceci signifie qu'une partie importante des peptides antimicrobiens a été perdue au cours de la purification (pH d'élution n'est pas optimale, perte au cours du lavage des colonnes ou bien mauvais choix de la souche indicatrice) ou bien dégradée (absence de manipulation de la bactériocine en gardant le froid « la glace »). Il est entendu que la mesure de la quantité de bactériocine est une estimation indirecte qui se fait à travers la mesure de l'activité. Néanmoins, l'activité spécifique, qui constitue un bon indice de l'efficacité de purification, a, quant à elle, augmenté. En effet, pour les bactériocines de la souche *E. faecium* E14, elle augmente de 269,72 (fraction initiale) à 3690,88 (fraction I) pour atteindre 52459,02 (fraction II).

Tableau 28. Suivi de l'activité antimicrobienne des bactériocines étudiées au cours des étapes de purification.

Souche à purifiée	Etape de purification	Vol (ml)	A ₂₈₀	A ₂₈₀ Totale ^a	Activité (UA/ml)	Activité totale ^b (UA)	Activité spécifique ^c	Taux de recouvrement (%)
C. maltaromaticum CPN1	Surnageant de la culture	400	0,0250	10,036	200	80000	80	100
	Echange de cation	75	0,346	26	400	30000	1154	37,5
	HPLC-RP, C8 semi-préparative	7	0,285	2	3200	22400	11200	28
	HPLC-RP, C18 analytique	2,5	0,32	0,8	6400	16000	20000	20
L. plantarum C	Surnageant de la culture	1000	1,404	1404	1600	1600000	1139,601	100
	Phase inverse	162	1,693	274,26	6400	1036800	3780,272	64,8
	Echange de cation	405	0,001	0,445	1600	648000	16x 10 ⁵	40,5
L. plantarum B	Surnageant de la culture	1000	2,80	2800	800	800000	285,7143	100
	Phase inverse	160	0,577	92,32	6400	1024000	11091,85	128
	Echange de cation	161	0,015	2,415	3200	515200	213333,3	64,4
L. plantarum LS3	Surnageant de la culture	1000	1,391	1391	3200	3200000	2300,503	100
	Phase inverse	149	2,18	324,82	12800	1907200	5871,56	59,6
	Echange de cation	450	0,031	13,95	1600	720000	51612,9	22,5
E. durans A4	Surnageant de la culture	1000	1,408	1408	200	200000	142,045	100
	Phase inverse	212	0,564	119,56	1600	339200	2836,879	169,6
	Echange de cation	232	0,018	4,176	400	92800	22222,22	46,4
E. durans T4	Surnageant de la culture	1000	1,397	1397	200	200000	143,1639	100
	Phase inverse	125	0,548	685	1600	200000	2919,708	100
	Echange de cation	339	0,05	16,95	200	67800	4000	33,9
P. acidilactici P1	Surnageant de la culture	2000	1,549	3098	6400	12800000	4131,698	100
	Phase inverse	170	1,821	309,57	51200	8704000	28116,42	68
	Echange de cation	400	0,048	19,2	3200	1280000	66666,67	10
E. faecium E14	Surnageant de la culture	2000	1,483	2966	400	800000	269,7235	100
	Phase inverse	165	1,734	286,1	6400	1056000	3690,888	132
	Echange de cation	550	0,061	335,5	800	440000	52459,02	55
E. faecium E16	Surnageant de la culture	2000	1,513	3026	12800	25600000	8460,013	100
	Phase inverse	217	1,77	384,09	51200	11110400	28926,55	43,4
	Echange de cation	465	0,044	204,6	6400	2976000	145454,5	11,625
E. faecalis CAN1	Surnageant de la culture	1000	1,571	157,1	800	800000	509,2298	100
	Phase inverse	180	1,565	281,17	3200	576000	2044,728	72
	Echange de cation	500	0,012	6	200	100000	16666,67	12,5
P. acidilactici CAN2	Surnageant de la culture	2000	1,511	3022	6400	12800000	4235,606	100
	Phase inverse	368	1,835	675,28	25600	9420800	13950,95	73,6
	Echange de cation	415	0,017	7,055	800	332000	47058,82	2,6
L. paracasei GRU3	Surnageant de la culture	1000	1,567	1567	400	400000	127,6324	100
	Phase inverse	125	1,690	211,25	12800	1600000	7573,964	400
	Echange de cation	540	0,079	42,66	200	108000	5063,291	27
E. faecalis SAL1	Surnageant de la culture	1000	1,501	1501	1600	1600000	1065,956	100
	Phase inverse	155	1,467	227,38	3200	496000	2181,322	31
	Echange de cation	590	0,049	28,91	1600	944000	32653,06	59

^aAbsorbance A_{280} multipliée par le volume (ml).

^bActivité mesurée multipliée par le volume (ml).

^cActivité totale (UA) divisé par l'absorbance totale (280 nm).

III. Etude de l'activité des bactériocines purifiées

1. Spectre d'activité

1.1. Sur milieu solide

L'activité antimicrobienne des bactériocines purifiées sur milieu solide (gélose) a été testée par la technique des spots. Les bactériocines pures ont d'abord été remises en solution dans de l'eau ultra-pure stérile. La sensibilité a été testée sur une large gamme de bactéries indicatrices (tableau 30). Toutes les bactériocines testées ont montré une activité vis-à-vis de la plupart des bactéries cibles à Gram positif incluant certains pathogènes. Deux espèces à Gram négatif ont ainsi montré une sensibilité : en effet *S. marcescens* LC 448 vis-à-vis de la pédiocine PA-1 et de l'entérocin AS-48 et *E.coli* ATCC 25922 vis-à-vis de toutes les bactériocines testées. Le spectre d'activité de la pédiocine PA-1 purifiée (quelque soit l'espèce productrice) semble identique au spectre de la pédiocine PA-1 produite par la souche *L. plantarum* WHE 92 utilisée comme témoin producteur. La production de la pédiocine PA-1 et son spectre d'activité de ce dernier a été déjà identifiée par Ennahar *et al* (1996). Elle a un spectre d'activité relativement large regroupant diverses bactéries à Gram positif dont des bactéries lactiques et des pathogènes tels que *S. epidermidis* et *L. monocytogenes*. L'activité mesurée est très importante avec des diamètres de zones d'inhibition entre 15 et 25 mm. Il est à noter également qu'une certaine activité a été mesurée contre une bactérie à Gram négatif, *E. coli* ATCC 25922.

L'entérocin B a une activité vis-à-vis de la majorité des souches cibles testées, y compris des espèces pathogènes telles que *S. epidermidis* et *L. monocytogenes*. De même, la bactériocine Bac SJ2-8 et l'entérocin AS-48, possèdent un large spectre d'activité, s'étendant à la plupart des bactéries testées.

Les deux peptides 1071A et 1071B (constitutifs de l'entérocin 1071 produite par *E. faecalis* CAN1) ont des spectres d'activité relativement étroits. En effet, une large gamme de bactéries testées ne sont pas inhibées, et celles qui le sont montrent une faible sensibilité. Cette faible activité est liée au fait que ces deux peptides antimicrobiens doivent agir en synergie. Pour le confirmer, l'activité antimicrobienne exprimée en UA/ml, des deux peptides (à des quantités égales 10 μ l:10 μ l), soit individuellement, soit en mélange (entérocin 1071) est

présentée au Tableau 31. L'observation des résultats montre que l'activité antimicrobienne de l'entéroisine 1071 est plus élevée, quelque soit la souche cible testée. Ainsi, dans le cas de la souche indicatrice *L. monocytogenes* LC 40, l'activité de l'entéroisine 1071 est de 12800 UA/ml, tandis que celle de l'entéroisine 1071A est de 3200 UA/ml et celle l'entéroisine 1071B n'est que de 400 UA/ml, confirmant ainsi la synergie entre les deux peptides.

Tableau 29. Spectres d'activité des différentes bactériocines purifiées. L'activité a été quantifiée par mesure du diamètre des zones d'inhibition obtenues par la méthode des spots (MRS / 18h à 24h / 34°C). Toutes les souches indicatrices ont été cultivées dans un bouillon MRS.

Espèce	Référence	Bactériocines purifiées							
		Pédiocine PA-1 (Témoin)	Pédiocine PA-1	Plantaricine 423	Entéroisine B	BacS J2-8	Entéroisine AS-48	Entéroisine B	Entéroisine 1071 A
<i>B. cereus</i>	CIP 78.3	16	20	17	13	6	11	5	0
<i>B. cereus</i>	LC 447	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. subtilis</i>	ATCC 6633	0	0	0	0	11	9	0	0
<i>B. subtilis</i>	ATCC 9372	0	0	0	12	0	8	0	0
<i>E. columbae</i>	F10d	15	16	17	15	9	11	0	tr
<i>E. faecalis</i>	G9h	13	20	15	16	13	12	9	0
<i>E. faecalis</i>	LC E4	18	20	18	14	14	13	7	14
<i>E. faecalis</i>	LC 37	17	20	19	13	10	12	9	5
<i>E. faecalis</i>	CECT 481	18	20	17	13	13	13	11	0
<i>E. faecalis</i>	CECT 795	17	21	0	11	nd	11	8	6
<i>E. faecalis</i>	OA	16	25	20	6	7	0	0	0
<i>E. faecium</i>	LC 81	19	26	18	0	9	14	8	7
<i>E. faecium</i>	LC 25	19	21	17	10	13	14	10	5
<i>E. faecium</i>	DSM 10663	16	21	15	8	12	10	7	0
<i>E. faecium</i>	JA	tr	tr	25	9	0	16	0	0
<i>E. faecium</i>	ATCC 19434	nd	21	15	nd	0	14	15	
<i>E. faecium</i>	IT62	19	25	15	12	13	15	10	0
<i>E. faecium</i>	F1h	18	21	15	10	14	13	12	0
<i>E. faecium</i>	LC 37	12	20	17	0	8	12	8	0
<i>E. hirae</i>	CIP 5855	nd	20	17	nd	11	13	8	nd
<i>E. hirae</i>	LC 36	17	21	15	13	10	13	9	6
<i>E. mundtii</i>	LC 362	0	21	nd	12	0	12	10	5
<i>E. pseudoavium</i>	C8VS	19	22	17	0	9	11	7	0
<i>E. saccharolyticus</i>	ATCC 43076	16	20	17	11	13	12	9	6
<i>E. sulfureus</i>	LC 361	15	22	nd	10	nd	13	8	0
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	17	21	nd	9	11	12	5	12
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 10031	nd	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. plantarum</i>	ATCC 10241	10	20	nd	13	nd	13	13	0
<i>L. plantarum</i>	MGC	0	0	0	10	0	11	0	0
<i>L. plantarum</i>	LC 804	nd	24	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>L. sakei</i> ssp. <i>sakei</i>	ATCC 15521	18	21	18	11	12	13	9	6
<i>L. lactis</i>	RO50	12	nd	nd	0	nd	nd	nd	0

<i>L. lactis</i>	WHE 53	0	22	17	0	9	12	6	7
<i>L. lactis</i>	WHE 99	0	nd	nd	0	nd	nd	nd	0
<i>L. lactis</i>	WHE 102	17	22	nd	10	9	11	0	6
<i>L. lactis</i>	LC 61	19	19	nd	10	nd	11	6	0
<i>L. lactis</i>	LC 72	18	20	18	0	11	13	9	4
<i>L. lactis</i>	LC 73	16	20	18	12	0	13	0	0
<i>L. lactis</i>	LC 103	15	nd	16	8	8		nd	0
<i>L. lactis</i>	LC 406	17	22	18	14	10	12	7	0
<i>L. lactis</i>	LC 452	14	0	16	9	0	14	0	0
<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	LC 657	nd	20	17	nd	10	9	9	
<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	LC 54	15	25	19	10	nd	12	23	0
<i>L. innocua</i> 6a	LC 14	17	20	0	12	12	12	9	10
<i>L. innocua</i> 6b	6b	18	23	0	12	14	12	5	
<i>L. monocytogenes</i> 1/2c	LC 12	18	20	0	11		13	0	0
<i>L. monocytogenes</i> 3a	LC 9	16	23	15	10	13	14	0	11
<i>L. monocytogenes</i> 3b	LC 40	18	21	18	12	14	13	8	11
<i>S. typhimurium</i>	LC 443	nd	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. marcescens</i>	LC 448	nd	12	0	0	0	7	0	0
<i>S. marcescens</i>	ATCC 13880	nd	0	0	0	0	8	0	0
<i>S. aureus</i>	ATCC 6538	15	20	18	11	9	16	9	9
<i>S. aureus</i>	ATCC 6538	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 12228	14	21	15	9	nd	12	7	0
<i>S. xylosum</i>	LC 57	15	0	0	0	0	12	0	0
<i>L. plantarum</i>	Cette étude	0	nd	nd	9	nd	nd	nd	0
<i>L. plantarum</i>	Cette étude	0	nd	nd	10	nd	nd	nd	0
<i>E. durans</i>	Cette étude	14	nd	nd	0	nd	11	nd	0
<i>E. durans</i>	Cette étude	14	25	nd	11	nd	13	0	0
<i>L. paracasei</i>	Cette étude	0	24	0	0	nd	25	0	0
<i>E. faecalis</i>	Cette étude	15	0	17	0	13	10	0	0
<i>P. acidilactici</i>	Cette étude	0	29	nd	0	9	0	0	0
<i>E. faecium</i>	Cette étude	16	nd	15	0	nd	12	nd	7
<i>E. durans</i>	Cette étude	13	27	17	10	9	12	9	0
<i>E. faecium</i>	Cette étude	20	23	nd	0	11	11	0	0
<i>P. acidilactici</i>	Cette étude	0	26	nd	0	10	12	0	0
<i>L. plantarum</i>	Cette étude	10	nd	nd	13	nd	nd	nd	0
<i>E. faecalis</i>	Cette étude	14	0	17	nd	nd	25	0	0

nd : non déterminé

tr : trouble

Tableau 30. Comparaison de l'activité antimicrobienne (en UA/ml) de l'entéroïcine 1071 et des deux peptides antimicrobiens qui la constituent (entéroïcine 1071A et entéroïcine 1071B) à des quantités égales de 10µl : 10µl.

Souches indicatrices	Référence	Activité antimicrobienne en UA/ml		
		Entéroïcine 1071	Entéroïcine 1071A	Entéroïcine 1071B
<i>E. faecalis</i>	B2RM/37	3200	1600	200
<i>E. faecalis</i>	G8b	3200	1600	200
<i>L. monocytogenes 1/2c</i>	LC 12	6400	3200	200
<i>L. monocytogenes 3b</i>	LC 40	12800	3200	400
<i>L. innocua</i>	6b	12800	6400	400
<i>L. monocytogenes 3a</i>	LC 9	12800	6400	6400
<i>E. columbae</i>	F10d	12800	3200	400
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	6400	3200	200
<i>S. aureus</i>	ATCC 6538	3200	1600	200

1.1. Dans milieu liquide

Trois concentrations de pédiocine PA-1 ont été testées sur 19 souches cibles dont la croissance en milieu liquide a été suivie par mesure de l'absorbance à l'aide d'un lecteur de microplaque Varioskan flash (Thermo Electron, Courtaboeuf, France). Une souche est considérée sensible lorsque sa croissance est partiellement ou complètement inhibée en présence de la bactériocine. Les différentes concentrations permettent de constater un éventuel effet dose-réponse et par la suite d'évaluer l'efficacité de la bactériocine. Des exemples des courbes de croissances obtenues sont présentés aux figures 31, 32, 33 et 34.

On peut ainsi observer que la croissance des deux bactéries cibles *E. hirae* CIP 5855 (figure 31) et *E. faecalis* E4 (Figure 32) est ralentie de façon importante en présence de la pédiocine PA-1 et que cet effet est d'autant plus important que la concentration de la bactériocine est élevée.

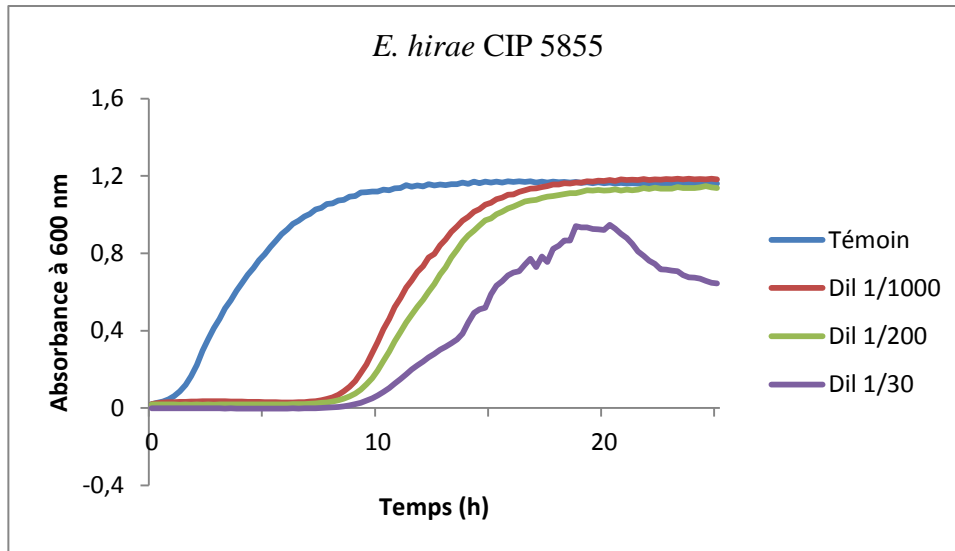


Figure 32. Croissance de la bactérie *E. hirae* CIP 5855 en présence de différentes concentrations de la pédiocine PA-1 dans le milieu MRS pendant 48h à 34°C.

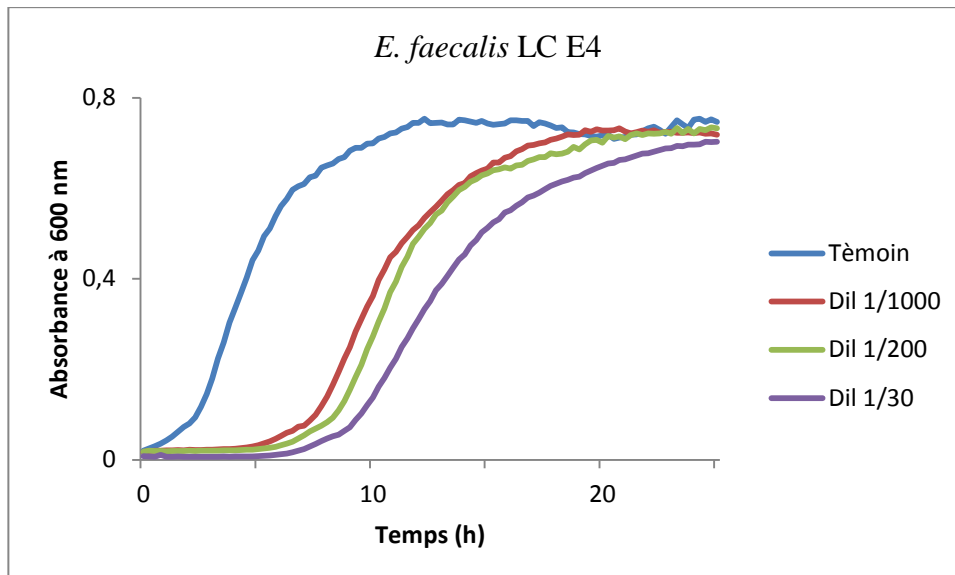


Figure 33. Croissance de la bactérie *E. faecalis* LC E4 en présence de différentes concentrations de la pédiocine PA-1 dans le milieu MRS pendant 48h à 34°C.

Par ailleurs, pour *L. plantarum* LC 804, la croissance est totalement inhibée en présence de la pédiocine PA-1 et cette sensibilité est d'autant plus marquée que la concentration de cette dernière est élevée (figure 33).

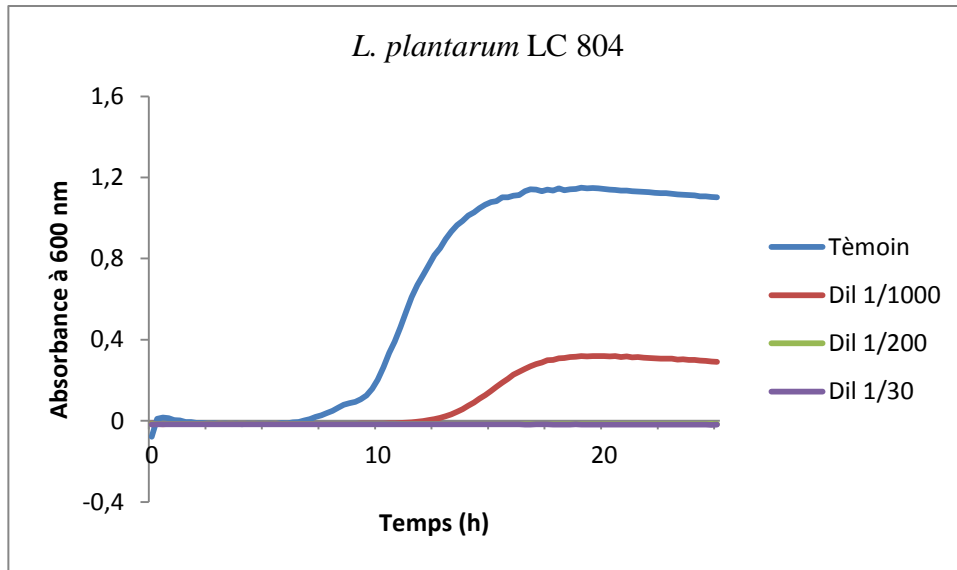


Figure 34. Croissance de la bactérie *L. plantarum* LC 804 en présence de différentes concentrations de la pédiocine PA-1 dans le milieu MRS pendant 48h à 34°C.

A l'inverse, comme le montre la figure 34, la présence de la pédiocine PA-1, n'induit pas de ralentissement de la croissance de la souche *E. faecium* JA. Une faible croissance est néanmoins observée pour la concentration la plus élevée de la pédiocine PA-1.

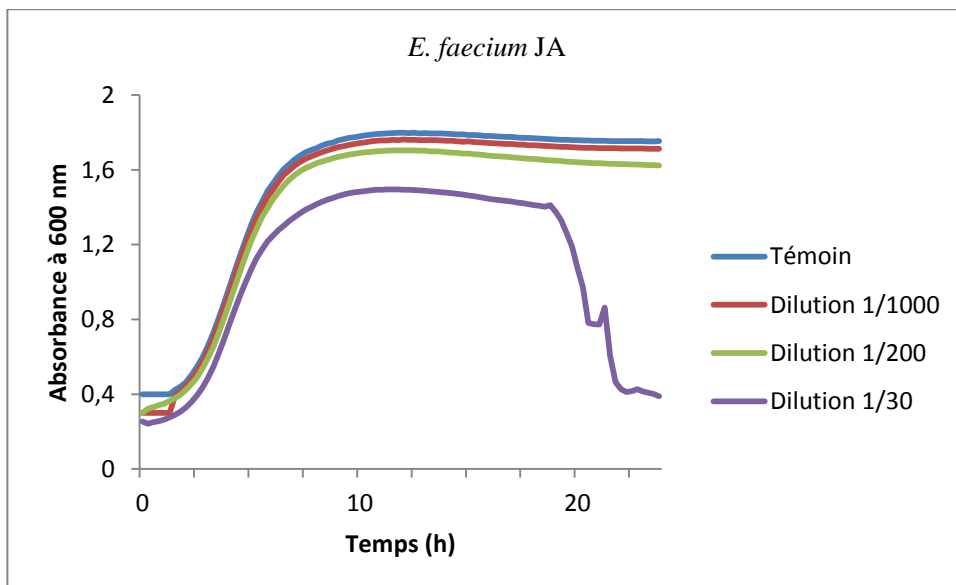


Figure 35. Croissance de la bactérie *E. faecium* JA en présence de différentes concentrations de la pédiocine PA-1 dans le milieu MRS pendant 48h à 34°C.

Afin d'évaluer la sensibilité de toutes les souches testées vis-à-vis de la pédiocine PA-1, le retard de croissance a été calculé (tableau 31). Il correspond au rapport entre le temps nécessaire pour atteindre une absorbance de 0,4 en présence de la bactériocine (Log Bac) à différentes concentrations et le temps équivalent pour le témoin (Log Tm) pour atteindre la même absorbance.

Tableau 31. La valeur du « Retard de croissance » calculée pour chaque bactérie indicatrice en fonction de différentes concentrations de pédiocine PA-1.

Espèce indicatrice	Références	Retard de croissance		
		100 ^{ème}	200 ^{ème}	30 ^{ème}
<i>L. plantarum</i>	JB	1,04	1,15	*
<i>L. sakei</i> ssp. <i>sakei</i>	ATCC 15521	1,18	1,2	1,2
<i>L. lactis</i>	WHE 53	*	*	*
<i>L. lactis</i>	LC 452	1,12	1,13	1,14
<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	LC 657	1,18	1,18	1,18
<i>L. acidophilus</i>	LC 660	1	1	1
<i>L. plantarum</i>	LC 804	1,14	1,15	1,19
<i>L. plantarum</i>	JB	1,02	1,02	1,04
<i>L.lactis</i>	WHE 99	1,15	1,15	1,18
<i>L.plantarum</i>	299v	1,19	1,16	1,2
<i>L. plantarum</i>	LC 56	1	1,04	1,13
<i>E. faecium</i>	LC 25	1,17	1,18	1,27
<i>E. faecium</i>	LC E16	1	1,01	1,05
<i>E. faecalis</i>	LC E4	1,10	1,12	1,13
<i>E. hirae</i>	CIP 5855	0,99	0,94	1,00
<i>E. sulfureus</i>	LC 361	1,18	1,19	1,2
<i>St. pneumoniae</i>	ATCC 6303	0,9	1,17	1,19
<i>L. monocytogenes 3b</i>	LC 40	*	*	*
<i>L. monocytogenes 1/2c</i>	LC 12	1,01	1,03	1,08
<i>L. innocua</i>	6b	0,3	1,36	1,40

* pas de croissance constatée

Le spectre d'activité de la pédiocine PA-1 déterminé dans ces conditions semble relativement large. En effet, la croissance de la plupart des souches indicatrices a été ralentie. Elle a même été totalement inhibée dans le cas *L. lactis* WHE 53 et *L. monocytogenes* LC 40. Néanmoins, dans de rares cas, notamment *L. acidophilus* 660, la croissance n'a aucunement été affectée par la présence de la pédiocine PA-1.

2. Mode d'action

Afin d'évaluer l'effet de différentes bactériocines sur la viabilité cellulaire plusieurs souches cibles ont été retenues (tableau 32). La sensibilité de ces dernières a été préalablement testée par la technique des spots (tableau 29). Le kit de viabilité LIVE/DEAD (BacLight Bacterial Viability) a été utilisé. Son principe est basé sur l'émission d'une double fluorescence verte et rouge. La fluorescence verte est émise par le fluorochrome (SYTO), capable de diffuser dans toutes les cellules, endommagées ou non, et d'émettre de la fluorescence une fois lié à l'ADN. Il permet ainsi de marquer la totalité des cellules testées. La fluorescence rouge est émise par l'Iodure de Propidium (IP) une fois lié à l'ADN. Ce fluorochrome ne peut pénétrer que dans les cellules dont les membranes sont altérées, seules les cellules mortes fluorescent en rouge

Tableau 32. Souches indicatrices retenues pour chacune des bactériocines testées.

Bactériocine	Souches indicatrices			
	Sensible		Insensible	
	Espèce	Référence	Espèce	Référence
Entéroïcine AS-48	<i>B. cereus</i>	CIP 78.3	<i>B. cereus</i>	LC 447
	<i>E. coli</i>	ATCC 25922		
	* <i>S. marcescens</i>	LC 448		
Pédiocine PA-1	<i>L. monocytogenes</i>	LC9	<i>B. cereus</i>	LC 447
	<i>E. coli</i>	ATCC 25922	<i>S. marcescens</i>	ATCC 13880
Entéroïcine 1071	<i>E. coli</i>	ATCC 25922	<i>L. monocytogenes</i>	LC 9
	<i>S. aureus</i>	ATCC 6538	<i>S. typhimurium</i>	LC 443
Plantaricine 423	<i>L. monocytogenes</i>	LC 40	<i>S. typhimurium</i>	LC 443
	<i>B. cereus</i>	CIP 78.3	<i>B. cereus</i>	LC 447
BacSJ2-8	<i>L. monocytogenes</i>	LC 40		
	* <i>S. aureus</i>	ATCC 6538		

*Très peu sensible

La viabilité de la souche *B. cereus* LC 447 (résistante) ne semble pas affectée par l'entéroïcine AS-48 (figure 35), du fait que le rapport de fluorescence verte/rouge reste constant. Par contre, pour les souches *B. cereus* CIP 78.3, *E. coli* ATCC 25922 et *S. marcescens* LC 448, il y a une baisse progressive de ce rapport lors de l'exposition à l'entéroïcine AS-48. Ceci signifie que l'augmentation de la fluorescence rouge de l'IP au profit de SYTO 9 due aux endommagements des membranes cibles par l'entéroïcine AS-48

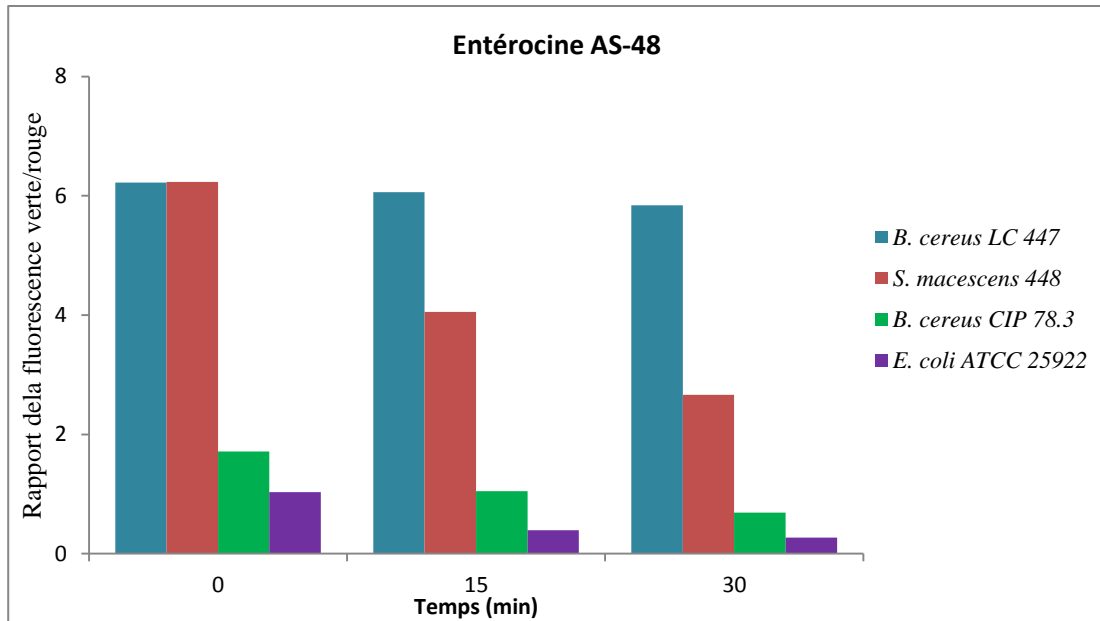


Figure 36. Suivi de la viabilité cellulaire, exprimée par le rapport de la fluorescence verte/rouge, lors de l'exposition à l'entéroisine AS-48.

Concernant la pédiocine PA-1 et l'entéroisine 1071, les résultats sont présentés aux figures 36 et 37. On constate que la baisse de la fluorescence est progressive et similaire pour toutes les souches testées, qu'elles soient sensibles ou résistantes et ceci pour les deux bactériocines.

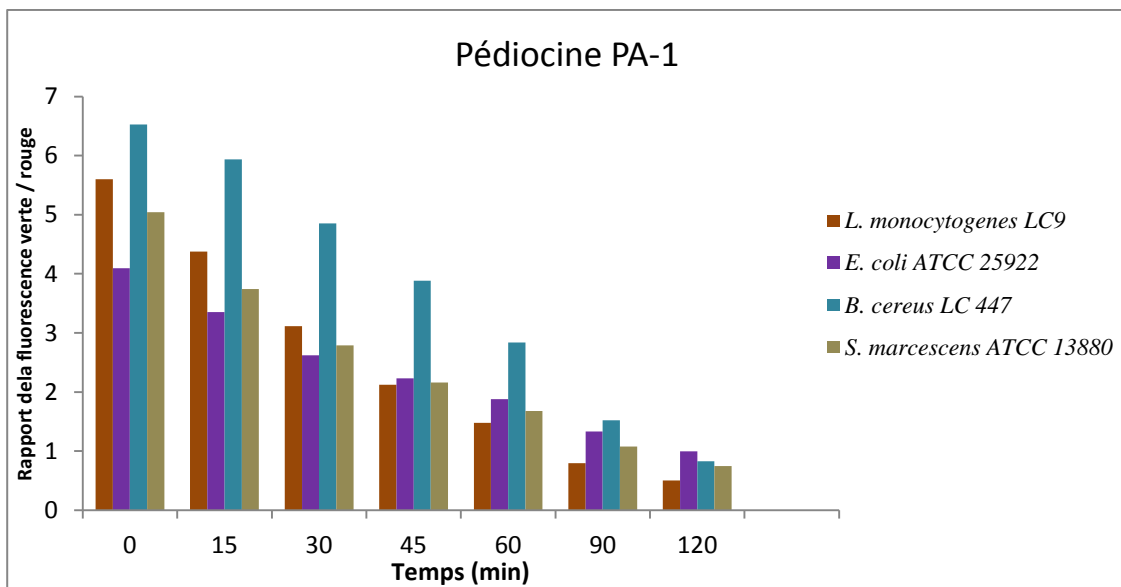


Figure 37. Suivi de la viabilité cellulaire, exprimée par le rapport de la fluorescence verte/rouge, lors de l'exposition à la pédiocine PA-1.

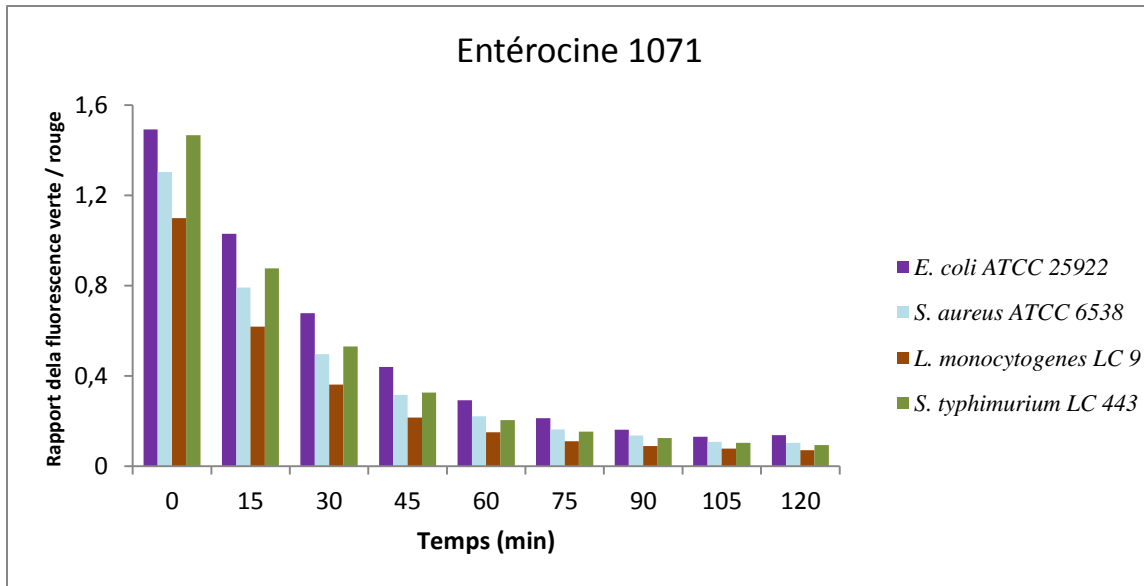


Figure 38. Suivi de la viabilité cellulaire, exprimée par le rapport de la fluorescence verte/rouge, lors de l'exposition à l'entéroicine 1071.

Par ailleurs, les deux souches cibles *S. typhimurium* LC 443 et *B. cereus* LC 447 testées résistantes par la méthode des spots à la plantaricine 423, ne montrent pas non plus de sensibilité en milieu liquide. En effet, le rapport de fluorescence reste stable au cours de l'exposition à cette bactériocine (figure 38).

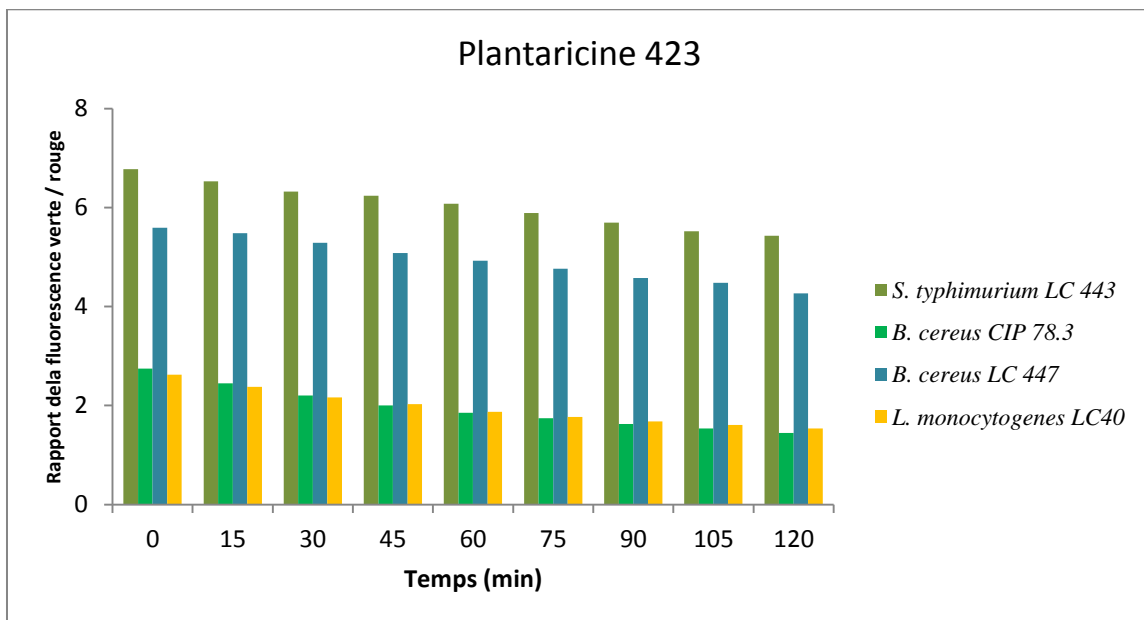


Figure 39. Suivi de la viabilité cellulaire, exprimée par le rapport de la fluorescence verte/rouge, lors de l'exposition à la plantaricine 423.

Par contre les souches : *L. monocytogenes* LC40, et *B. cereus* CIP 78.3 ayant révélé une sensibilité à la plantaricine 423, ainsi que les souches *L. monocytogenes* LC40 et *S. aureus* ATCC 6538 ayant révélé une sensibilité à la BacSJ2-8 par la méthode des spots, n'ont montré aucune baisse de fluorescence (figures 38 et 39), suggérant une résistance à ces deux bactériocines en milieu liquide.

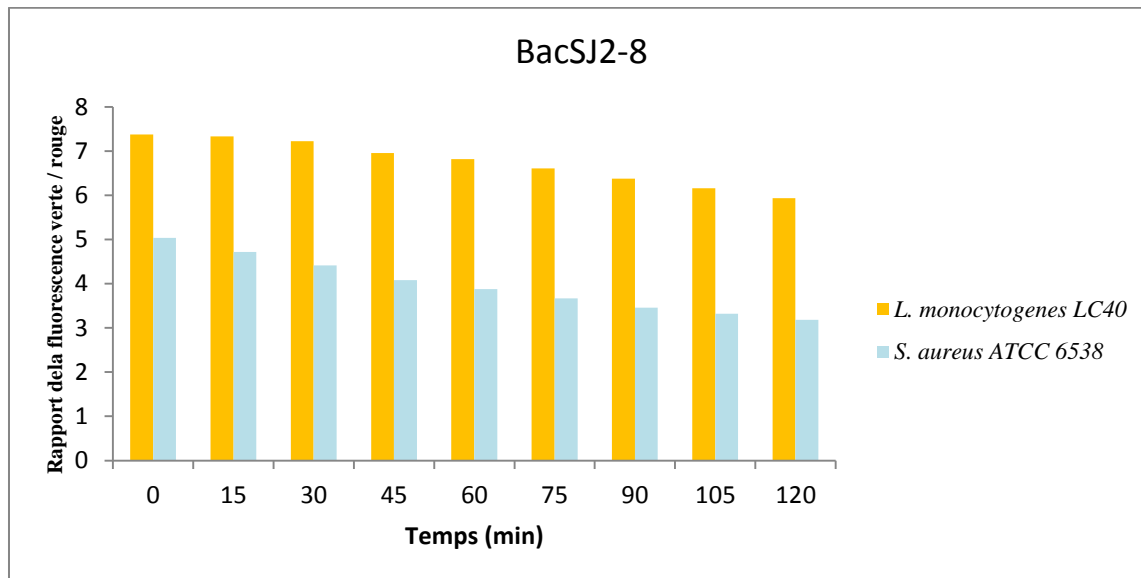


Figure 40. Suivi de la viabilité cellulaire, exprimée par le rapport de la fluorescence verte/rouge, lors de l'exposition à la BacSJ2-8.

IV. Etude de la résistance de *L. monocytogenes*

La mise en évidence in vitro de mutants résistants de la souche *L. monocytogenes* 3b en présence des bactériocines produites par les deux souches *L. plantarum* B (mono-productrice) et *L. paracasei* GRU3 (multi-productrice) est effectuée par la méthode des passages successifs. La souche de *L. monocytogenes* 3b est cultivée en présence, de l'extrait de culture de *L. plantarum* B (contenant la pédiocine PA-1) et dans l'autre cas de l'extrait de culture de *L. paracasei* GRU3 (contenant la pédiocine PA-1, la BacSJ2-8, l'entérocoque AS-48 et l'entérocoque B). Les deux extraits sont testés dans une gamme de dilutions en série (tableau 33). Après incubation, les cellules de *L. monocytogenes* 3b ayant pu se développer à la concentration d'extrait de culture la plus élevée (G1) sont remises en culture dans les mêmes conditions afin d'obtenir les générations suivantes G2, G3 et G4.

Tableau 33. Test de croissance des variants de *L. monocytogenes* 3b à différentes concentrations des extraits actifs des deux souches *L. plantarum* B et *L. paracasei* GRU3.

Extraits de culture actifs	Dilutions						
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/2048
<i>L. plantarum</i> B	Ab	Ab	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr
<i>L. paracasei</i> GRU3	Ab	Ab	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr

Ab : Absence de croissance

Tr : Trouble de croissance

Le test d'activité, réalisé par la méthode des spots, des extraits actifs des deux souches *L. plantarum* B et *L. paracasei* GRU3, avec *L. monocytogenes* 3b comme souche cible, s'est révélé positif. Les diamètres des zones d'inhibitions obtenues sont respectivement de 20 et de 12 mm. En présence des extraits actifs dilués jusqu'au 1/4, aucune croissance de la souche *L. monocytogenes* 3b n'est détectée. Cependant, à partir de la dilution 1/8, une croissance de *L. monocytogenes* 3b est observée dans tous les cas. Par ailleurs, les cellules de *L. monocytogenes* isolées à partir de cultures obtenues, utilisées comme indicateurs dans la méthode des spots, n'ont pas montré de zones d'inhibition en présence des extraits actifs dilués. Ces résultats semblent indiquer que la souche *L. monocytogenes* 3b a acquis une résistance à partir de la première génération mutante. Mais des expériences complémentaires sont nécessaires afin de confirmer ces données.

V. Application des souches productrices des bactériocines B et GRU3 dans un modèle de Lben

L'effet de bactéries lactiques productrices de bactériocines sur une population de *L. monocytogenes* 3b dans un modèle de fabrication de Lben traditionnel marocain est évalué. La souche cible est dénombrée dans l'échantillon de départ (lait frais) et dans le produit fini (lait fermenté). La capacité de deux souches bactériocinogènes à inhiber *L. monocytogenes* 3b est testée : la souche *L. plantarum* B productrice de la pédiocine PA-1; et la souche *L. paracasei* GRU3 productrice de la pédiocine PA-1, de l'entéroccine AS-48, de l'entéroccine B et de la BacSJ2-8. Le dénombrement de la souche *L. monocytogenes* 3b en absence des substances inhibitrices est effectué en parallèle (témoin). Le tableau 34 résume les résultats obtenus pour le lait et le Lben.

Tableau 34. Concentration cellulaire en UFC/ml de *L. monocytogenes* 3b dans l'échantillon témoin, en présence de la souche *L. plantarum* B, ainsi qu'en présence de la souche *L. paracasei* GRU3.

Temps (en heure)	Concentration en UFC/ml de <i>L. monocytogenes</i> 3b		
	Témoin	En présence de <i>L. plantarum</i> B	En présence de <i>L. paracasei</i> GRU3
0	$2,2 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$
22	$8,3 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$

Comme le montre le tableau 34, la concentration cellulaire exprimée en UFC/ml de la souche cible *L. monocytogenes* 3b dans l'échantillon témoin augmente au cours du temps. Le nombre de cellules de *L. monocytogenes* 3b est multiplié par environ un facteur 4 dans le produit fini après 22 heures d'incubation. Par contre, en présence des souches productrices de bactériocines, *L. plantarum* B et *L. paracasei* GRU3, la concentration cellulaire de la souche cible reste globalement stable autour de $2,0 \times 10^4$. Les résultats semblent indiquer que la production in situ des bactériocines résulte en une stabilisation de la flore pathogène au cours du processus de fermentation du lait. Ces résultats ne sont néanmoins pas suffisants pour conclure quant à un effet inhibiteur des souches productrices. Des expériences sont en cours afin de compléter ce travail.

Discussion

I. Recherche de bactéries lactiques productrices des bactériocines

Des bactéries lactiques ont été isolées dans l'objectif de sélectionner des espèces productrices de bactériocines. Les isollements ont été effectués à partir de produits traditionnels marocains (Beurre, Jben, Lben et Smen) et de différents types de fromages affinés français. La production de bactériocines par différentes bactéries lactiques isolées à partir de produits laitiers fermentés d'origine marocaine a déjà fait l'objet d'un certain nombre de travaux. Ces derniers ont révélé l'existence de nombreuses souches douées d'une activité anti-microbienne importante appartenant notamment aux espèces *L. lactis*, *E. faecium* et *E. faecalis* (Benkerroum *et al.*, 2000; Elotmani *et al.*, 2002; Benkerroum *et al.*, 2007). Toutefois, rares sont les bactériocines à avoir été purifiées et analysées (Khaoua *et al.*, 1997; Achemchem *et al.*, 2004; Achemchem *et al.*, 2005; Achemchem, 2014). Par contre, bien des bactériocines ont été identifiées à partir de bactéries isolées de fromages de différentes origines géographiques (Daba *et al.*, 1991; Ennahar *et al.*, 1996; Herbin *et al.*, 1997; Alvarado *et al.*, 2005; Topisirovic *et al.*, 2006; Malini & Savitha, 2012).

Dans notre travail, des souches bactériocinogènes appartenant à sept espèces et quatre genres différents ont été identifiées : deux souches d'*E. faecalis* (SAL1, CAN1), deux souches d'*E. faecium* (E14, E16), deux souches d'*E. durans* (A4, T4), quatre souches de *L. plantarum* (B, C, LS3 et MJP1), une souche de *L. paracasei* (GRU3), cinq souches de *P. acidilactici* (P1, CAN2, OIF3, BAA2, SNF1) et une souche de *C. maltaromaticum* (CPN1). La présence de différentes espèces de bactéries lactiques dans les produits analysés était prévisible du fait de la variété de produits et d'origines géographiques.

Les extraits de culture bactériens peuvent parfois contenir deux ou plusieurs substances antimicrobiennes recherchées (bactériocines), certaines souches étant des multi-producteurs. Ces bactériocines peuvent avoir des spectres d'activité très différents, d'où l'importance du choix des souches indicatrices. En effet, la sensibilité de ces dernières doit permettre de détecter les bactériocines produites afin qu'aucune ne puisse être négligée au cours des différentes étapes de purification.

Afin de choisir les meilleurs indicateurs, plusieurs souches ont été testées, incluant des espèces apparentées aux souches productrices et des espèces potentiellement pathogènes appartenant aux genres *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Listeria*, *Serratia* ou encore *Escherichia*.

La sensibilité de ces dernières vis-à-vis des bactéries lactiques a été déjà décrite dans différentes études (De Vuyst & Vandamme, 1994; Ammore *et al.*, 2006; Cavicchioli *et al.*, 2015). Les souches indicatrices retenues sont celles ayant montré la plus grande sensibilité. Par ailleurs, afin d'éviter les contraintes liées à la manipulation de souches pathogènes, celles-ci n'ont pas été retenues comme indicatrices.

II. Purification et déterminations structurales des bactériocines

Les différentes analyses ont permis l'identification de 10 bactériocines différentes produites à partir des 17 souches bactériennes. Il s'est avéré qu'une même bactériocine a pu être produite par différentes espèces bactériennes, que certaines souches étaient mono-productrices alors que d'autres étaient multi-productrices.

La maltaricine CPN

Cette bactériocine est produite par la souche *C. maltaromaticum* CPN1 (Hammi *et al.*, 2016). Elle a une masse moléculaire de 4427,10 Da et une séquence peptidique de 44 acides aminés. La masse calculée à partir de la séquence peptidique, est de 4429,11 Da, soit 2 Da de plus par rapport à la masse expérimentale mesurée ce qui suggère la présence d'un pont disulfure entre les deux résidus de cystéine aux positions 9 et 14. La maltaricine CPN présente une partie N-terminale hydrophile et une partie C-terminale plus hydrophobe, ce qui est une caractéristique typique des bactériocines de la sous-classe IIa.

La maltaricine CPN montre des ressemblances avec les séquences peptidiques de certaines bactériocines de la sous-classe IIa (tableau 35). En effet, la pisciocine CS526, bactériocine produite par *C. piscicola* CS526, a une masse moléculaire de 4430 Da et une séquence peptidique de 43 acides aminés (Yamazaki *et al.*, 2005) montrant une grande similitude avec la maltaricine CPN. De même, d'autres bactériocines appartenant à cette même sous-classe IIa présentent des similitudes importantes avec la maltaricine CPN, notamment dans la partie N-terminale (tableau 35). Par ailleurs, parmi les bactériocines connues produites par *C. maltaromaticum* aucune ne concorde totalement avec la maltaricine CPN objet de ce travail (tableau 36).

Tableau 35. Alignement de la séquence d'acides aminés de la maltaricine CPN avec les séquences des bactériocines proches de la sous-classe IIa. Les encadrés indiquent les acides aminés polaires (vert) et apolaires (orange) hautement conservés.

Bactériocine	Séquence	Référence
Maltaricine CPN	K Y Y G N G L S C N K K G C T V D W G T A I G I I G N N A A A N W A T G G A A G W N K G	(Hammi <i>et al.</i> , 2016)
Piscicocine CS526	K Y Y G N G L S X N K K G X T V D W G T A I G I I G N N A A A N X A T G G A A G X N K	(Yamazaki <i>et al.</i> , 2005)
Listériocine 743A	K S Y G N G V H C N K K K C W V D W G S A I S T I G N N S A A N W A T G G A A G W K S	(Kalmokoff <i>et al.</i> , 2001)
Piscicoline 126/Piscicocine V1a	K Y Y G N G V S C N K N G C T V D W S K A I G I I G N N A A A N L T T G G A A G W N K G	(Bhugaloo-Vial <i>et al.</i> , 1996)
Entéroicine HF	K Y Y G N G V S C N K K G C S V D W G K A I G I I G N N A A A N L T T G G K A G W K G	(Arbulu <i>et al.</i> , 2015)
Avicine A	T Y Y G N G V S C N K K G C S V D W G K A I S I I G N N S A A N L A T G G A A G W K S	(Birri <i>et al.</i> , 2010)
Mundticine	K Y Y G N G V S C N K K G C S V D W G K A I G I I G N N S A A N L A T G G A A G W S K	(Bennik <i>et al.</i> , 1998)
Mundticine KS/Enterocine CRL35	K Y Y G N G V S C N K K G C S V D W G K A I G I I G N N S A A N L A T G G A A G W K S	(Kawamoto <i>et al.</i> , 2002)
Mundticine L	K Y Y G N G L S C N K K G C S V D W G K A I G I I G N N S A A N L A T G G A A G W K S	(Feng <i>et al.</i> , 2009)
Sakacine P	K Y Y G N G V H C G K H S C T V D W G T A I G N I G N N A A A N W A T G G N A G W N K	(Tichaczek <i>et al.</i> , 1994)
Bavaricine A	K Y Y G N G V H X G K H S X T V D W G T A I G N I G N N A A A N X A T G X N A G G	(Larsen <i>et al.</i> , 1993)
Coaguline	K Y Y G N G V T C G K H S C S V D W G K A T T C I I N N G A M A W A T G G H Q G T H K C	(Le Marrec <i>et al.</i> , 2000)
Pédiocine PA-1	K Y Y G N G V T C G K H S C S V D W G K A T T C I I N N G A M A W A T G G H Q G N H K C	(Marugg <i>et al.</i> , 1992)

Tableau 36. Masses moléculaires des différentes bactériocines produites par différentes souches de *C. maltaromaticum*.

Bactériocine	Souche productrice	Masse (Da)	Référence
Maltariocine CPN	<i>C. maltaromaticum</i> CPN1	4427,10	(Hammi <i>et al.</i> , 2016)
Carnobactériocine BM1 (piscicocine V1b)	<i>C. piscicola</i> LV17B	4524,6	(Quadri <i>et al.</i> , 1994)
	<i>C. piscicola</i> V1	4526	(Bhugaloo-Vial <i>et al.</i> , 1996)
	<i>C. maltaromaticum</i> UAL307	4523,8	(Martin-Visscher <i>et al.</i> , 2008)
Carnobactériocine B2	<i>C. piscicola</i> LV17B	4969,9	(Quadri <i>et al.</i> , 1994)
	<i>C. maltaromaticum</i> C2	5018,9	(Tulini <i>et al.</i> , 2014)
Piscicocine V1a	<i>C. piscicola</i> V1	4416	(Bhugaloo-Vial <i>et al.</i> , 1996)
Piscicoline 126	<i>C. piscicola</i> JG126	4416,6 6	(Jack <i>et al.</i> , 1996)
Carnocycline A	<i>C. maltaromaticum</i> UAL307	5880	(Martin-Visscher <i>et al.</i> , 2008)
Piscicocine CS526	<i>C. maltaromaticum</i> CS526	4430	(Yamazaki <i>et al.</i> , 2005)
Carnobactériocine B1	<i>C. maltaromaticum</i> C2	4524,7	(Tulini <i>et al.</i> , 2014)
Carnobactériocine X	<i>C. maltaromaticum</i> C2	3602,1	(Tulini <i>et al.</i> , 2014)
Carnolysine (A1 et A2)	<i>C. maltaromaticum</i> C2	4179,4 et 3052,1	(Tulini <i>et al.</i> , 2014)

La pédiocine PA-1

C'est la bactériocine typique des bactériocines de la sous-classe IIa, elle fait partie des premières bactériocines caractérisées appartenant à cette sous-classe (Fimland *et al.*, 1996; Ennahar *et al.*, 2000). Il s'agit de l'une des bactériocines les plus étudiée depuis plus d'une vingtaine d'années, ainsi qu'en témoigne l'abondant travail scientifique s'y rapportant (Henderson *et al.*, 1992; Chikindas *et al.*, 1993; Ennahar *et al.*, 1996; Hornet *et al.*, 1998 ; Rodriguez *et al.*, 2002; Naghmouchi *et al.*, 2008; Devi Sundru & Halami, 2011; Oppedgård *et al.*, 2015). La pédiocine PA-1 est un peptide cationique, amphiphile, constitué par l'enchaînement de 44 acides aminés, et ayant une masse moléculaire de 4621 Da (Henderson *et al.*, 1992; Ennahar *et al.*, 1996). Dans notre travail, la pédiocine PA-1 a été purifiée à partir de différentes espèces de bactéries lactiques. En effet, 14 souches sur les 17 étudiées produisent de la pédiocine PA-1, dont 5 entérocoques, 4 lactobacilles et 5 pédiocoques. Concernant ces deux derniers genres, nos résultats sont en accord avec les données de la littérature. En effet, nous avons identifié cette bactériocine chez *P. acidilactici* (CAN2, BAA2, OIF3, SNF1) tout comme Henderson *et al.* (1992), Elegadob *et al.* (1997) et Cintas *et al.* (1998) l'ont identifiée, respectivement chez *P. acidilactici* PAC-1.O, *P. acidilactici* M et P et *acidilactici* Z102. De même, nous l'avons mise en évidence chez *L. plantarum* B, C et LS3 et chez *L. paracasei* GRU3, comme Ennahar *et al.* (1996) l'ont identifiée chez *L. plantarum* WHE92. A notre connaissance, la production de cette bactériocine n'avait été détectée jusqu'à présent que chez les pédiocoques et les lactobacilles.

Nos résultats montrent, pour la première fois, la production de la pédiocine PA-1 chez des espèces appartenant au genre *Enterococcus*. En effet, nous avons pu la purifier à partir de trois espèces différentes d'entérocoques, *E. faecium* (E16 et E14), *E. faecalis* (SAL1) et *E. durans* (A4 et T4). Or, les entérocoques sont essentiellement connus pour leurs productions de différentes classes d'entérocoques (Aguilar-Galvez *et al.*, 2012).

Les entérocoques très répandus dans la nature, sont fréquemment rencontrés dans le tractus gastro-intestinal humain et animal. C'est l'un des groupes de bactéries lactiques les plus controversés en raison de leur association à diverses infections humaines et de leur résistance à une large variété d'antibiotiques (Inoue *et al.*, 2006). Pourtant, ils sont connus pour leur implication depuis des siècles dans la transformation de nombreux produits alimentaires, particulièrement les produits fermentés (Hugas *et al.*, 2003). En effet, en plus de l'amélioration des caractéristiques sensorielles et organoleptiques, ils contribuent à la maturation de certaines variétés de fromages, tels que les fromages traditionnels dans de nombreux pays méditerranéens (Foulquié Moreno *et al.*, 2006). On les retrouve également dans d'autres aliments fermentés, comme les saucisses et les olives.

Les entérocoques peuvent aussi être utilisés comme agents antimicrobiens grâce à la production des entérocoques (Aguilar-Galvez *et al.*, 2012). Nos résultats montrent que certaines souches d'entérocoques, peuvent produire en plus, de la pédiocine PA-1. Or, cette dernière est utilisée massivement comme bio-conservateur dans de nombreux aliments et ce depuis un certain nombre d'années (Ennahar *et al.*, 1998a ; Woraprayote *et al.*, 2013).

Tous ces facteurs peuvent constituer un atout et renforcer l'utilisation de certaines souches d'entérocoques comme producteurs de la pédiocine PA-1 dans les produits fermentés, notamment les fromages. Toutefois, cette utilisation comme cultures starter ou cultures protectrices ne peut se faire qu'après une sélection minutieuse et des tests pour confirmer leurs innocuités (De Vuyst *et al.*, 2003).

La masse moléculaire de la pédiocine PA-1 purifiée, mesurée par l'ESI-Q-TOF, est de 4621,32 Da, sauf dans le cas de la souche *P. acidilactici* P1 où la masse est de 4637,32 Da, soit 16 Da de plus par rapport à la masse de la pédiocine PA-1. Ce phénomène a déjà été répertorié dans la littérature. En effet, certains travaux ont montré qu'au cours de leur conservation, certaines bactériocines, et notamment la pédiocine PA-1, subissaient une oxydation (Fimland *et al.*, 1996; Johnsen *et al.*, 2000; Rodriguez *et al.*, 2002). Cette oxydation des atomes de soufre des résidus méthionine de la bactériocine et leur transformation en sulfoxyde (figure 40) est à l'origine de l'augmentation de la masse moléculaire de la pédiocine PA-1-ox de 16 Da. Elle induit également

une augmentation de l'hydrophobicité de la molécule, responsable de la réduction de son activité spécifique d'un facteur d'environ 100 (Fimland *et al.*, 1996).

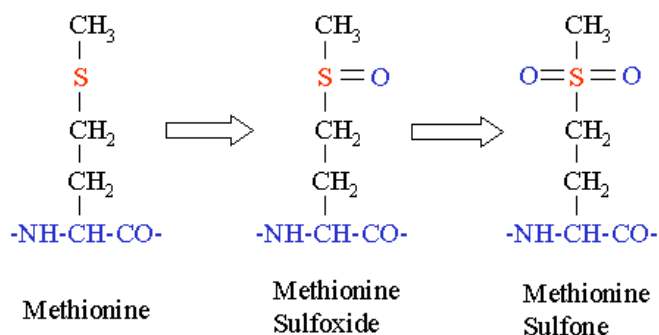


Figure 41. Oxydation des résidus méthionine dans une structure protéique.

Les producteurs multiples

Parmi les autres résultats marquants obtenus, la sélection de 7 producteurs multiples de bactériocines (deux ou plusieurs) appartenant à la même classe ou à des classes différentes (tableau 37)

Tableau 37. Souches multi-productrices de bactériocines.

Souche productrice	Bactériocine produite	Classification
<i>E. durans</i> A4	Pédiocine PA-1	Classe IIa
	Entéroccine P	Classe IIa
<i>E. durans</i> T4	Pédiocine PA-1	Classe IIa
	Entéroccine A	Classe IIa
	Entéroccine AS-48	Classe IIc
<i>E. faecalis</i> CAN1	Entéroccine 1071	Classe IIb
	Entéroccine AS-48	Classe IIc
<i>E. faecium</i> E14	Pédiocine PA-1	Classe IIa
	Entéroccine A	Classe IIa
	Entéroccine B	Class II
	Entéroccine P	Classe IIa
<i>L. plantarum</i> MJP1	Entéroccine AS-48	Classe IIc
	Plantaricine 423	Classe IIa
<i>L. paracasei</i> GRU3	Pédiocine PA-1	Classe IIa
	Entéroccine AS-48	Classe IIc
	BacSJ2-8	Class II
	Entéroccine B	Class II

Les entéroccines A et P (tableau 37) n'ont pas pu être purifiées, leur présence a toutefois pu être établie grâce à l'amplification de leurs gènes de structure respectifs par PCR. Le fait que ces deux peptides n'aient pas pu être purifiés peut être lié à plusieurs facteurs, tels que des conditions

de productions défavorables, des conditions de purification inadaptées ou encore une possible dégradation. A titre d'exemple, l'influence de la température sur la production des bactériocines est un facteur déterminant. Chez la souche multi-productrice *E. faecium* L50, la production des entérocinés P et Q a été détectée à une température maximale de 37 et 47 °C respectivement, tandis que les entérocinés L50A et L50B, synthétisées par la même souche, ont nécessité une température allant de 16 à 25 °C (Cintas *et al.*, 2000). Une autre souche, *E. faecium*, NKR-5-3, a montré une production multiple d'enterocines (NKR-5-3A, B, C et D) dépendante de la température (Perez *et al.*, 2012). L'entérociné NKR-5-3B est produite dans une gamme de températures d'incubation plus large (20 à 30°C) que celle des entérocinés NKR-5-3A, C et D (25°C). Néanmoins, plusieurs autres souches d'*E. faecium* multi-productrices synthétisent leurs bactériocines dans les mêmes conditions expérimentales. Ainsi, la souche *E. faecium* TI36 produit deux entérocinés A et B, dont l'activité est synergique, à la même température 30°C (Casaus *et al.*, 1997). De même, la souche *E. faecium* IT62 produit trois entérocinés différentes L50A, L50B et IT à une température de 37°C (Izquierdo *et al.*, 2008a).

Les autres bactériocines provenant de producteurs multiples ont été purifiées, analysées et identifiées (tableau 37). Quatre espèces différentes (*L. paracasei* GRU3, *L. plantarum* MJP1, *E. faecalis* CAN1 et *E. faecalis* SAL1) produisent l'entérociné AS-48. Les masses moléculaires mesurées pour chacun des peptides purifiés sont respectivement de 7147,06 ; 7145,09 ; 7148,06 et 7148,06 Da. Ces masses sont proches de celles répertoriées dans la littérature et correspondent à la masse de l'entérociné AS-48 produite par *E. faecalis* ssp. *liquefaciens* S-48, qui sont de 7,150.17 Da (Samyn *et al.*, 1994) et de 7149.42 Da (Montalban-Lopez *et al.*, 2008). Afin de vérifier ce résultat, la présence des déterminants génétiques impliqués dans la production de l'entérociné AS-48 a été confirmée par PCR.

L. plantarum est l'une des espèces de bactéries lactiques les plus répandues dans la nature, elle est souvent impliquée dans les fermentations alimentaires, notamment végétales (Verellen *et al.*, 1998). La souche *L. plantarum* MJP1 produit en plus de l'entérociné AS-48, la plantaricine 423 (Tableau 37). Cette dernière a une séquence peptidique de 37 acides aminés, déterminée par dégradation d'Edman, identique à celle purifiée à partir de *L. plantarum* 423, isolée à partir de la bière de sorgho (Van Reenen *et al.*, 1998; Van Reenen *et al.*, 2002). La production multiple de bactériocines par le genre *Lactobacillus* a déjà été rapportée dans la littérature. A titre d'exemple, la souche *L. plantarum* LPCO10 isolée à partir d'olives vertes fermentées a révélé une activité inhibitrice vis-à-vis de plusieurs bactéries Gram positif due à la production combinée de deux plantaricines S et T (Jiménez-Dfazet *et al.*, 1993).

Une autre souche, *L. paracasei* GRU3, a quant à elle montré une combinaison intéressante de 4 bactériocines appartenant à différentes classes (tableau 37), dont une ayant une masse de 5369,57 Da et une séquence peptidique de 50 acides aminés identique à celle de la bacSJ2-8 produite par la souche *L. paracasei* ssp. *paracasei* BGSJ2-8 (Kojic *et al.*, 2010).

III. Etude de l'activité des bactériocines purifiées

1. Spectre d'activité

L'activité antimicrobienne des bactériocines purifiées a été testée par la méthode des spots. En présence de deux bactériocines de la sous-classe IIa : la pédiocine PA-1 et la plantaricine 423, plusieurs souches cibles pathogènes à Gram positif se sont montrées très sensibles. C'est le cas notamment de différentes espèces de *Listeria* dont la croissance a été inhibée par les deux bactériocines. Cette forte activité *anti-Listeria* est probablement liée à la présence, au niveau de l'extrémité N-terminale des séquences peptidiques du motif YGNGV. La présence de ce motif étant spécifique des bactériocines de la sous-classe IIa (Horn *et al.*, 1998 ; Ennahar *et al.*, 2000 ; Rodriguez *et al.*, 2002). D'autres bactéries à Gram positif pathogènes (*Bacillus* et *Staphylococcus*) et non pathogènes (*Enterococcus*, *Lactobacillus* et *Pediococcus*) ont montré également une sensibilité vis à vis de ces bactériocines.

En ce qui concerne les bactéries à Gram négatif, seules deux bactériocines (la pédiocine PA-1 et la bacSJ2-8) ont montré une certaine activité contre les souches testées : *E. coli* ATCC 25922 et *S. marcescens* LC 448. En effet, l'activité inhibitrice contre des bactéries à Gram négatif est un phénomène inhabituel et n'a jusqu'à présent été signalé que pour peu de bactériocines, à titre d'exemple : la thermophylin 81, produite par *S. thermophilus* et la plantaricine 35D produite par *L. plantarum* (Albano *et al.*, 2007). D'après ces auteurs, ce sont la structure et la composition de la membrane externe des bactéries à Gram négatif qui ne permet pas l'accès de certaines bactériocines, dont la pédiocine PA-1, à la membrane plasmique. En effet, il a été rapporté que cette résistance des bactéries à Gram négatif est probablement due à la richesse de leur membrane externe en LPS. Ces derniers empêcheraient les bactériocines d'accéder au lipide II site de fixation des bactériocines (Chatterjee *et al.*, 2005).

Pour l'entéroisine AS-48, le spectre d'activité s'étend à la globalité des souches cibles testées à Gram positif potentiellement pathogènes (*Bacillus*, *Listeria* et *Staphylococcus*) et non pathogènes (*Enterococcus*, *Lactobacillus* et *Pediococcus*), ainsi que des souches à Gram négatif pathogènes (*E. coli* et *Serratia*). L'entéroisine AS-48 est ainsi caractérisée par un large spectre d'activité, comme cela a été rapporté précédemment (Galvez *et al.*, 1986; Montalbán-López *et al.*,

2008). Elle est également caractérisée par une activité relativement intense et une grande stabilité, ce qui est attribué à sa structure circulaire (Montalbán-López *et al.*, 2012). Ces caractéristiques font de l'entéroïcine AS-48 l'un des meilleurs candidats pour les utilisations dans la conservation des aliments (Abriouel *et al.*, 2003).

Concernant l'entéroïcine 1071 (constituée de deux peptides 1071A et 1071B), nos résultats montrent que quelque soit la souche indicatrice utilisée (pathogène ou non), l'activité obtenue est plus importante lorsque les deux peptides sont combinés que lorsqu'ils sont utilisés individuellement. Cette action synergique entre les deux composants de l'entéroïcine 1071 a déjà été évoquée dans la littérature (Maldonado-Barragán *et al.*, 2009 ; Drider *et al.*, 2011).

2. Mode d'action

La viabilité des bactéries cibles exposées aux bactériocines a été évaluée par le Kit LIVE/DEAD Back Light (Molecular Probes, Leiden, Pays-Bas). Le rapport de fluorescence verte/rouge permet de déduire l'état d'altération des cellules et donc leur viabilité, puisque plus la membrane cellulaire est altérée, plus l'iodure de propidium peut pénétrer et plus le rapport diminue. Nos résultats montrent que les souches testées sensibles par la méthode des spots à l'entéroïcine AS-48, le sont également en milieu liquide. Le rapport de fluorescence (verte/rouge) baissant progressivement au cours du temps, signifie une pénétration du IP et donc une altération «progressive» des membranes cellulaires. L'action positive de l'entéroïcine AS-48 sur les cellules cibles testées semble donc liée à une détérioration de leurs membranes cellulaires. Le même test réalisé en présence de la pédiocine PA-1 et de l'entéroïcine 1071, montre une baisse du rapport de fluorescence pour toutes les souches testées et notamment des souches testées résistantes par la méthode des spots. Bien que celle-ci soit la méthode la plus utilisée pour détecter l'activité inhibitrice des bactériocines, il semblerait que la sensibilité des cellules bactériennes en milieu liquide, soit plus élevée. On peut donc suggérer, comme pour l'entéroïcine AS-48, que la destruction des cellules indicatrices par la pédiocine PA-1 et l'entéroïcine 1071 est due à l'altération de leurs membranes cellulaires.

En réalisant le même test (Kit LIVE/DEAD), en présence de la plantaricine 423 et la de bacSJ8-2, certaines souches cibles testées, sensibles par la méthode des spots (*L. monocytogenes* LC40, *S. aureus* ATCC 6538 et *B. cereus* CIP 78.3), se sont révélées résistantes à ces deux bactériocines en milieu liquide. Leur viabilité semble indiquer l'absence d'altération de leurs membranes cellulaires. Ceci laisse supposer que ces deux bactériocines agissent selon d'autres modes d'action. Il peut s'agir notamment d'une perturbation du fonctionnement de la

cellule (Koo *et al.*, 2001) telle qu'une inhibition de la biosynthèse de la paroi bactérienne (Brotz *et al.*, 1998), une inhibition de la synthèse des acides nucléiques (Patrzykat *et al.*, 2002), une inhibition de la synthèse protéique ou encore une inhibition de certaines fonctions enzymatiques (Brogden 2005). Un résultat similaire a été décrit en utilisant le même test pour la thurincine H (Wang *et al.*, 2014). Les auteurs ont observé une réduction de 99,99% de la population bactérienne, mais sans aucun effet sur la bactérie cible en milieu liquide. Ils ont en conclu que le mode d'action de la thurincine H ne dépendait pas de la rupture de la membrane cellulaire.

Ainsi, l'étude de l'activité inhibitrice de des bactériocines isolées a montré une activité vis-à-vis de plusieurs espèces potentiellement pathogènes à Gram positif (*Listeria*, *Staphylococcus* et *Bacillus*) et certaines espèces à Gram négatif (*Escherichia* et *Serratia*), en plus de leur activité vis-à-vis des bactéries lactiques (caractéristique commune à toutes les bactériocines des bactéries lactiques).

Parmi les spectres d'activité établis (tableau 29), d'importantes différences ont été observées. L'entéroccine AS-48 cyclique (classe II) est celle dont l'activité est la plus forte et le spectre le plus large. Les autres bactériocines de classe II (pédiocine PA-1, plantaricine, BacSJ2-8 et entéroccine B) présentent des spectres d'activité relativement larges et différents les uns des autres. Toutes ces bactériocines ne présentent pas de similitudes particulières dans leurs structures, ce qui est probablement à l'origine de leurs différents spectres d'activité. Concernant les deux peptides (1071A et 1071B) de l'entéroccine 1071 leur action synergique, établie auparavant (Balla *et al.*, 2000 ; Maldonado-Barragán *et al.*, 2009 ; Mary *et al.*, 2011), a été confirmée. Par ailleurs, alors que le spectre d'activité de l'entéroccine 1071 a été déjà décrit (Balla *et al.*, 2000). Nous avons à notre connaissance établie pour la première fois les spectres d'activité des peptides individuels. Ces derniers sont relativement étroits et très différents. Il en est de même en ce qui concerne l'intensité de l'activité antimicrobienne des deux peptides qui est également très différente. Les différences de structure assez marquées entre les deux peptides sont à l'origine de leurs activités complémentaires et expliquer leur effet synergique.

Il apparaît ainsi que la production d'une bactériocine donnée, comme c'est le cas de la pédiocine PA-1, ne dépend ni de l'espèce, ni de son origine, ni de sa répartition géographique. De même, une même souche bactérienne (Ex: *L. paracasei* GRU3) peut produire de multiples bactériocines avec des propriétés et des activités très différentes. La production multiple de bactériocines ne peut que renforcer l'utilisation des souches productrices dans la bio-conservation et dans la lutte contre les germes indésirables. Il est en effet logiquement suggéré que la production multiple de bactériocines aide la souche productrice à la lutte contre le problème de la résistance de certaines souches cibles (Cintas *et al.*, 2000). Par ailleurs, le fait que les modes

d'actions des bactériocines soient différents, est important pour la complémentarité des effets antimicrobiens et l'élargissement de spectres d'activité et par conséquent pour l'augmentation de l'efficacité de l'inhibition (Perez *et al.*, 2012).

CONCLUSION GENERALE

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis des siècles pour la production de nombreux aliments fermentés. Grâce à leurs propriétés fermentaires, ainsi qu'à leur capacité de survivre et de se développer dans diverses conditions environnementales, elles prolongent la durée de conservation des produits. En outre, les peptides antimicrobiens « bactériocines », produits par ces bactéries et doués d'activités inhibitrices dirigées notamment contre plusieurs pathogènes des aliments renforcent cette propriété de bio-conservation. Ces bactériocines permettent en effet de lutter efficacement contre les différentes bactéries indésirables, pathogènes, d'altération ou résistantes aux antibiotiques. A ce jour, vu la rigidité des lois réglementant la mise sur le marché d'une substance destinée à l'alimentation humaine, seule la nisine est autorisée comme conservateur alimentaire. Néanmoins, l'utilisation de souches productrices de bactériocines, notamment les bactéries lactiques, qui jouissent du statut GRAS, est très prometteuse.

Les bactériocines se distinguent des antibiotiques par leur production ribosomique et leurs spectres relativement étroits. Elles possèdent des propriétés qui les placent comme substances sans danger pour l'homme de par leur sensibilité aux protéases du tube digestif et l'absence de toxicité. La résistance aux traitements thermiques et aux variations de pH (pour quelques-unes), l'activité bactéricide et l'absence de résistance croisée avec les antibiotiques font des bactériocines des candidats potentiels pour des applications alimentaires.

Dans ce travail nous nous sommes fixés comme objectifs de purifier et d'identifier les bactériocines produites par des bactéries lactiques isolées à partir d'échantillons d'aliments de différentes zones géographiques (produits fermentés traditionnels marocains et fromage français à base de lait cru). Pour cela, 17 bactéries productrices sont sélectionnées et identifiées soit par séquençage du gène de l'ARN 16S, soit par spectrométrie de masse. Il s'agit de sept espèces différentes: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *P. acidilactici* et *C. maltaromaticum*.

Le protocole de purification des bactériocines utilisé dans ce travail est basé sur différentes techniques chromatographiques: chromatographie flash en phase inverse, chromatographie échangeuse de cations et HPLC en phase inverse sur colonne semi-préparative C8 suivie d'une colonne analytique C18.

Une fois purifiées, les bactériocines sont identifiées d'abord par mesure de leurs masses par spectrométrie de masse ESI-TOF et ensuite par caractérisation de leurs structures, soit par une approche de type protéomique (digestion trypsique, Nano LC-MS/MS et

recherche dans les bases de données protéomiques), soit par séquençage d'Edman, soit par une combinaison des deux approches. Les dix-sept souches bactériennes d'origines très diverses (produits laitiers et non laitiers collectés au Maroc et en France) sont productrices soit d'une bactériocine (mono-productrice) soit de plusieurs bactériocines (multi-productrices) (tableau 38).

Ce travail nous a permis de purifier et d'identifier une nouvelle bactériocine, d'une masse de 4427,10 Da (maltarinine CPN). Celle-ci appartient à la classe IIa et est produite par la souche *C. maltaromaticum* CPN isolée d'un fromage de type Camembert à base de lait cru. Par ailleurs, quatorze souches bactériennes appartenant à différentes espèces (*E. durans*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *L. plantarum*, *L. paracasei* et *P. acidilactici*) produisent le même peptide de 4621,20 Da dont la séquence de 44 acides aminés est identique à celle de la pédiocine PA-1. Parmi ces 14 souches, 5 appartiennent à trois espèces d'entérocoques (*E. durans*, *E. faecium* et *E. faecalis*) identifiées pour la première fois comme producteurs de la pédiocine PA-1 (tableau 38). Or, les entérocoques sont essentiellement connus pour leur production de différentes classes d'entérocoques. Etant donné le potentiel de biopréservation démontré de la pédiocine PA-1, les entérocoques pourraient représenter une alternative viable et efficace pour produire de la pédiocine PA-1 dans les aliments fermentés en particulier certains types de fromage. Par ailleurs, cinq souches parmi les 14 productrices de pédiocine (*E. faecium* E14, *E. faecalis* SAL1, *E. durans* A4, *E. durans* T4 et *L. paracasei* GRU3) produisent en plus d'autres bactériocines telles que la Bac SJ2-8 et les entérocoques A, AS-48, B et P (tableau 38).

La mise en évidence de souches multi-productrices de bactériocines appartenant à la même classe ou à des classes différentes est très intéressante en vue d'une application dans les produits alimentaires. En effet, les bactériocines de classes différentes n'ont pas forcément le même mode d'action, et donc leur combinaison permet de réduire les risques de développement de résistance parmi les bactéries cibles.

L'activité des bactériocines purifiées testée sur milieu solide et en milieu liquide montre des spectres d'activité plus ou moins larges incluant, pour certains peptides, des bactéries pathogènes à Gram positif telles que *S. aureus*, *B. cereus* et *L. monocytogenes* et même à Gram négatif telles que *S. marcescens* et *E. coli*.

Des essais d'application de deux souches productrices de bactériocines, *L. plantarum* B (productrice de pédiocine PA-1) et *L. paracasei* GRU3 (productrice de la pédiocine PA-1, de l'entérocoque AS-48, de l'entérocoque B et de la BacSJ2-8) dans du lait fermenté (Lben) en

vue de lutter contre *L. monocytogenes* sont en cours. Les résultats préliminaires, relativement encourageants ouvrent la voie vers l'optimisation des protocoles, l'étude de la reproductibilité et les essais avec d'autres matrices alimentaires.

Parmi les perspectives donnant suite directe à nos travaux :

- La purification et la caractérisation structurale des bactériocines dont la présence a été détectée uniquement par la recherche par PCR des gènes codant correspondants ;
- L'étude de l'activité antimicrobienne de l'ensemble des bactériocines identifiées contre un panel plus large de bactéries cibles ;
- L'étude de la relation structure-fonction pour certaines des bactériocines purifiées dont le mode d'action n'est pas clairement établi;
- L'exploitation des activités antimicrobiennes dans différentes matrices alimentaires en vue de lutter contre les pathogènes et notamment *L. monocytogenes*.
- Le développement de levains lactiques spécifiques contenant des combinaisons de souches dotées de pouvoirs antimicrobiens pour d'éventuelles applications dans des modèles des produits fermentés traditionnels.

Tableau 38. Tableau récapitulatif des différentes souches productrices, des bactériocines purifiées et des séquences peptidiques correspondantes.

Bactériocine purifiée	Masse (Da)	Séquence peptidique	Technique d'identification	Souche productrice	Référence	Origine
Maltarin CPN	4427,10	KYYGNGLSCNKKGCTVDWGTAIGIIGN-NAAANWATGGAAGWNKG	Dégradation d'Edman	<i>C. maltaromaticum</i>	CPN1	Fromage Camembert Petit Normand
BacSJ2-8	5369,57	YSYFGGSNGYSWRDKRGHWHYTVTK-GGFETVIGIIGDGWGSAGAPGPGQH	Nano LC-MS/MS	<i>L. paracasei</i>	GRU3	Fromage Gruyère Bio AOP
Plantaricine 423	3928,74	KYYGNGVTCGKHSCSVNWGQAFSCSV-SHLANFGHGKC	Nano LC-MS/MS	<i>L. plantarum</i>	MJP1	Fromage Morbier
Entéroccine 1071A	4285,2	ESVFSKIGNAVGPAAYWILKGLGNMSD-VNQADRINRKKH	Dégradation d'Edman	<i>E. faecalis</i>	CAN1	fromage Cantal AOP
Entéroccine 1071B	3896,12	GPGKWLPLWLPAYDFVTGLAKGIGKE-GNKNKWKNV	Séquençage des déterminants génétiques			
Entéroccine A	4828	TTHSGKYYGNGVYCTKNKCTVDWAK-ATTTCIAGMSIGGFLGGAIPGKC	Séquençage des déterminants génétiques	<i>E. durans</i>	T4	Lben
				<i>E. faecium</i>	E14	Fromage Reblochon Fruitier
Entéroccine B	5459,68	ENDHRMPNELNRPNNLSKGGACGAAL-	Séquençage des déterminants génétiques	<i>E. faecium</i>	E14	Fromage Reblochon Fruitier
	5461,97	AGGLFGIPKGPLAWAAGLANVYSKCN		<i>L. paracasei</i>	GRU3	Fromage Gruyère Bio AOP
Entéroccine P	4648,91	ATRSYGNVYCNNSKCVNNGWGEAKE-NIAGIVISGWASGLAGMGH	Séquençage des déterminants génétiques	<i>E. durans</i>	A4	Poivron fermenté
				<i>E. durans</i>	T4	Lben
				<i>E. faecium</i>	E14	Fromage Reblochon Fruitier
Entéroccine AS-48	7147,06	MAKEFGIPAAVAGTVLNVVEAGGWVT-	Séquençage des déterminants génétiques	<i>L. paracasei</i>	GRU3	Fromage Gruyère Bio AOP
	7145,09	TIVSILTAVGSGGLSLLAAAGRESIKA-		<i>L. plantarum</i>	MJP1	Fromage Morbier
	7148,06	YLKKEIKKKGKRAVIAW		<i>E. faecalis</i>	CAN1	Fromage Cantal AOP
	7148,06			<i>E. faecalis</i>	SAL1	Fromage Salers AOP
Pédiocine PA-1	4621,20	KYYGNGVTCGKHSCSVDWGKATTCII-NNGAMAWATGGHQGNHKC	Nano LC-MS/MS	<i>E. durans</i>	A4	Lben
				<i>E. durans</i>	T4	Lben
				<i>E. faecium</i>	E16	Fromage Camembert
				<i>E. faecalis</i>	SAL1	Fromage Salers AOP

Conclusion générale

		<i>E. faecium</i>	E14	Fromage Reblochon Fruitier
		<i>L. plantarum</i>	B	Beurre
		<i>L. plantarum</i>	C	Smen
		<i>L. plantarum</i>	LS3	Lben
		<i>L. paracasei</i>	GRU3	Fromage Gruyère Bio AOP
		<i>P. acidilactici</i>	BAA2	Fromage Brie de Meaux
		<i>P. acidilactici</i>	CAN2	Fromage Cantal AOP
		<i>P. acidilactici</i>	OIF3	Ossau Iraty
		<i>P. acidilactici</i>	SNF1	Fromage Saint Nectaire
		<i>P. acidilactici</i>	P1	Fromage Reblochon de Savoie Pochat

Pédiocine PA-1-ox 4637,32

-

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdelmajid** , Z, R Hammami , I Fliss, et J Ben Hamida. «A New Structure-based Classification of Gram-positive Bacteriocins.» *Protein J* 29 (2010): 432–439.
- Abee**, T, L Krockel, et C Hill. «Bacteriocins: modes of action and potentials in food.» *Int J Food Microbiol* 28 (1995): 169–185.
- Abriouel**, H, E Valdivia, M Martinez-Bueno, M Maqueda, et A Galvez. «A simple method for semi-preparative-scale production and recovery of enterocin AS-48 derived from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* A-48-32 .» *J Microbiol Meth* 55 (2003): 599–605.
- Abriouel**, H, et al. «Enterocin AS-48RJ: a variant of enterocin AS-48 chromosomally encoded by *Enterococcus faecium* RJ16 isolated from food.» *Syst Appl Microbiol* 28 (2005): 383–397.
- Achemchem**, F, J Abrini, M Martinez-Bueno, E Valdivia, et M Maqueda. «Purification et caractérisation d'une bactériocine anti-*Listeria* produite par *Enterococcus faecium* F-420 isolé à partir de lait cru de chèvre.» Marrakech: Congrès International de Biochimie , 2004.
- Achemchem**, F, M Martinez-Bueno, J Abrini, E Valdivia, et M Maqueda. «*Enterococcus faecium* F58, a bacteriocinogenic strain naturally occurring in Jben, a soft, farmhouse goat's cheese made in Morocco.» *J Appl Microbiol* 99 (2005): 141–150.
- Achemchem**, F. *Bactériocines de bactéries lactiques de lait et de fromage de chèvre*. Édité par C Morin. Presses Académiques Francophones, 2014.
- Adams**, M.R, et P Marteau. «On the safety of lactic acid bacteria from food.» *Int J Food Microbiol* 27 (1995): 263-264.
- Aguilar-Galvez**, A, R Dubois-Dauphin, J Destain, D Campos, et P Thonart. «Les entérocoques : avantages et inconvénients en biotechnologie (synthèse bibliographique).» *Biotechnol Agron Soc Environ* 16 (2012): 67-76.
- Aguirre**, M, et M.D Collins. «Lactic acid bacteria and human clinical infection.» *J Appl Bacteriol* 75 (1993): 95-107.
- Albano**, H, S.D Todorov , C.A Van Reenen, T Hogg, L.M.T Dicks, et P Teixeira. «Characterization of two bacteriocins produced by *Pediococcus acidilactici* isolated from “Alheira”, a fermented sausage traditionally produced in Portugal.» *Int J Food Microbiol* 116 (2007): 239 –247.
- Altermann**, E, et al. «Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM.» *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005): 3906–3912.
- Alvarado**, C, B.E García-Almendárez, S.E Martin, et C Regalado. «Anti-*Listeria monocytogenes* Bacteriocin-Like Inhibitory Substances From *Enterococcus faecium* UQ31 Isolated from Artisan Mexican-Style Cheese.» *Curr Microbiol* 51 (2005): 110-115.
- Amaraa**, A.A, et A Shibli. «Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management.» *Saudi Pharm J* 23 (2015): 107–114.
- Ammor**, S, G Tauveron, E Dufour, and I Chevallier. "Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogens bacteria isolated from the same meat small-scale facility." *Food Control* 17 (2006): 454-468.
- Anand**, S.K, R.A Srinivasan, and L.M Rao. "Antibacterial activity associated with *Bifidobacterium bifidum*-I." *Cult Dairy Prod J* 2 (1984): 6–7.
- Ananou**, S, et al. "Evaluation of an enterocin AS-48 enriched bioactive powder obtained by spray drying ." *Food Microbiol* 27 (2010): 58-63.
- Anderssen**, E.L, D.B Diep, I.F Nes, V.G Eijsink, et J Nissen-Meyer. «Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A.» *Appl Environ Microbiol* 64 (1998): 2269-2272.
- ANSES** , Agence Nationale de Sécurité Sanitaire Alimentation, Environnement, Travail. "Listeria monocytogenes, Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments." 2011.
- Arbulu**, S, et al. «Solution Structure of Enterocin HF, an Antilisterial Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecium* M3K31.» *J Agric Food Chem* 63 (2015): 10689–10695.
- Arthur**, C.O, et Atte von Wrigh. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. 4e. CRC Press, 2011.
- Asensio**, C, et J.C Perez-Diaz. «A new family of low molecular weight antibiotics from enterobacteria.» *Biochem Biophys Res Commun* 69 (1976): 7-14.
- Atrih**, A, N Rekhif, A. J Moir, A Lebrhi, and G Lefebvre. « Mode of action, purification and amino acid sequence of plantaricin C19, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19 ». *Int J Food Microbiol*.68 (2001b): 93-104.
- Axelsson**, L. *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects* . 3e. Édité par S Salsinen, A.V Wright, & A. Ouwehand. Vol. 633. New York, USA: Marcel Dekker, 2004.
- Aymerich**, T, H Holo, L.S Havarstein, M Hugas, M Garriga, et I.F Nes . «Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins.» *Appl Environ Microb* 62 (1996): 1676-1682.
- Badel**, S, T Bernardi, et P Michaud. «New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides.» *Biotechnol. Adv* 29 (2011): 54-66.
- Badis**, A, N Laouabdia-Sellami, D Guetarni, M Kihal, and R Ouzrout. "Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales «Arabia et Kabyle»." *Sci. Technol* 23 (2005): 30-37.
- Balla**, E, L. M Dicks, M Du Toit, M. J Van Der Merwe, and W. H Holzapfel. «Characterization and cloning of the genes encoding enterocin 1071A and enterocin 1071B, two antimicrobial peptides produced by *Enterococcus faecalis* BFE 1071 ». *Appl Environ Microbiol*.66 (2000): 1298-1304.
- Baquero**, F, et F Moreno. «The microcins.» *FEMS Microbiol Letters* 23 (1984): 117-124.
- Barbosa**, M.S, S.D Todorov, C.H Jurkiewicz, et B.D.G.M Franco. «Bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* MBSa2 entrapped in calcium alginate during ripening of salami for control of *Listeria monocytogenes* .» *Food Control* 47 (2015): 147-153.

- Barrett**, E, M Hayes, P O'Connor, G Gardiner, G. F Fitzgerald, C Stanton, R. P Ross, and C Hill. «Salivaricin P, one of a family of two-component antilisterial bacteriocins produced by intestinal isolates of *Lactobacillus salivarius*». *Appl Environ Microbiol* 73 (2007): 3719-3723.
- Barry**, A.L. *Procedure for testing antibiotics in agar media: theoretical considerations*. Édité par Williams, Wilkins, & Baltimore. Vol. V. Antibiotics in Laboratory Medicine, 1980.
- Bassit**, N, Y Picque, D Picque, et G Corrieu . «Effect of initial oxygen concentration on diacetyl and acetoin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*». *Appl Environ Microbiol* 59 (1993): 1893-1897.
- Bastos**, M.C, H Ceotto, M.L Coelho, et J.S Nascimento. «Staphylococcal antimicrobial peptides: relevant properties and potential biotechnological applications.» *Curr pharma biotechnol* 10 (2009): 38-61.
- Belguesmia**, Y, K Naghmouchi, N.E Chihib, et D Drider. *Class Iia bacteriocins: current knowledge and perspectives*. Édité par D Drider, & S Rebuffat. Nantes: Springer Verlag, 2011.
- Belomaria**, M, Y Aboussaleh, A.O.T Ahami, O Bouazza, M Mahly, et Y Khayati. «Evolution des toxi-infections alimentaires collectives dans la région du Gharb-Chrarda-Bni Hsein au Nord Ouest du Maroc.» *Antropo* 21 (2010): 79-8
- Ben Omar**, N, A Castro, R Lucas, H Abriouel, N.M.K Yousif, et C.M.A.P Franz. «Functional and safety aspects of Enterococci isolated from different Spanish foods .» *Syst Appl Microbiol* 27 (2004): 118–130.
- Ben Omar**, S, N Nejari, and M.S Lahbabi. "Listeriose neonatale: une infection exceptionnelle au Maroc." *Arch Pediatr* 7 (2000): 428.
- Benkerroum**, N, H Oubel, et L Ben Mimoun. «Behaviour of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus* in yaghourt fermented with a bacteriocin-producing thermophilic starter.» *J Food Prot* 65 (2002): 799-805.
- Benkerroum**, N, et A.Y Tamime. «Technology transfer of some Moroccan: a review.» *Food Microbiol* 21 (2004): 399–413.
- Benkerroum**, N, H Oubel, M Zahar, S Dlia, et A Filali-Maltouf . «Isolation of a bacteriocin-production *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and application to control *Listeria monocytogenes* in jben.» *J Appl Microbiol* 89 (2000): 960-968.
- Benkerroum**, N, H Oubel, M Zahar, S Dlia, et A Filali-Maltouf. «Isolation of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and application to control *Listeria monocytogenes* in Moroccan jben.» *J Appl Microbiol* 89 (2000): 960-968.
- Benkerroum**, N, Y Ghouati, et H Ghalfi. «Screening for bacteriocin-producing Lactic Acid Bacteria from various Moroccan food products and partial characterization of putative bacteriocins.» *Biotechnol* 6 (2007): 481-488.
- Bennik**, M. H., B Vanloo, R Brasseur, L.G Gorris, and E. J Smid. «A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated *Enterococcus mundtii*: full characterization and interaction with target organisms ». *Biochim Biophys Acta*. 1373. (1998): 47-58.
- Bennik**, M.H.J, B Vanloo , R Brasseur, L.G.M Gorris, et E.J Smid. «A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated *Enterococcus mundtii*: full characterization and interaction with target organisms.» *Biochim Biophys Acta* 1373 (1998): 47-58.
- Berche**, B, A Brisabois, M Catteau, J.P Flandrois, et J.L.J.C Rocourt. «Rapport de la commission d'étude des risques liés à *Listeria monocytogenes*. Commission Listeria. AFSSA.» 2000.
- Beukes**, M, G Bierbaum, H.G Sahl, and J.W Hastings. "Purification and partial characterization of a murein hydrolase, millericin B, produced by *Streptococcus milleri* NMSCC 061." *Appl Environ Microbiol* 23–28 (2000): 66.
- Bhugaloo-Vial**, P, et al. «Purification and Amino Acid Sequences of Piscicocins V1a and V1b, Two Class Iia Bacteriocins Secreted by *Carnobacterium piscicola* V1 That Display Significantly Different Levels of Specific Inhibitory Activity.» *Appl Environ Microbiol* 62 (1996): 4410–4416.
- Bhunia**, A.K, M.C Johnson, and B Ray. "Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*." *J Appl Bacteriol* 65 (1988): 261-268.
- Birkemo**, G.A, T Luders, O Andersen, I.F Nes , and J Nissen-Meyer. "Hipposin, a histone-derived antimicrobial peptide in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.)." *Biochim Biophys Acta* 1646 (2003): 207-215.
- Birri**, D.J, D.A Brede, T Forberg, H Holo, et I.F Nes. «Molecular and genetic characterization of a novel bacteriocin locus in *Enterococcus avium* isolates from infants.» *Appl Environ Microbiol* 76 (2010): 483-492.
- Björkroth**, J, et W Holzappel. *Genera Leuconostoc, Oenococcus and Weissella*. 3e. The Prokaryotes, 2006.
- Boubkri**, C, A Tantaoui Elaraki, M Berrada, et N Benkerroum . «Caractérisation physico-chimique du lben marocain.» *Le Lait* 64 (1984): 436-447.
- Boukadida**, I, H Sboui, and K Monastiri. "La listériose humaine en Tunisie: deux nouveaux cas chez le nouveau-né." *Med Mal Infect* 24 (1994): 17-8.
- Brede**, D.A, T Faye, O Johnsborg, I Odegard , I.F Nes, et H Holo. «Molecular and genetic characterization of propionicin F, a bacteriocin from *Propionibacterium freudenreichii*.» *Appl Environ Microb* 70 (2004): 7303-7310.
- Brisabois**, A, et al. «Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers : situation en France et en Europe.» *Rev sci tech Off int Epiz* 16 (1997): 452-471.
- Brock**, T.D, et J.M Davie. «Probable identity of a group D hemolysin with a bacteriocine.» *J Bacteriol* 86 (1963): 708-712 .
- Brogden**, K.A. «Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?» *Nature reviews* 3 (2005): 238-250.
- Brotz**, H, et al. «Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and lantibiotics .» *Mol microbiol* 30 (1998): 317-327.
- Browder**, H.P, W.A Zygmunt , J.R Young, et P.A Tavormina. «Lysostaphin: enzymatic mode of action.» *Biochem Biophys Res Commun* 19 (1965): 383–389.
- Bultosa**, G. «Functional Foods: Dietary Fibers, Prebiotics, Probiotics, and Synbiotics.» *Encyclopedia of Food Grains* 2 (2016): 11–16.

- Caplice**, E, et G.F Fitzgerald. «Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation.» *Int J Food Microbiol* 50 (1999): 131–149.
- Carina**, A.M, G Oliver, et M.C Apella. «Protective effect of *Enterococcus faecium* J96, a potential probiotic strain, on chicks infected with *Salmonella Pullorum*.» *J Food Prot* 63 (2000): 1333-1337.
- Casaburi**, A, V Di Martino, P Ferranti, L Picariello, et F Villani. «Technological properties and bacteriocins production by *Lactobacillus curvatus* 54M16 and its use as starter culture for fermented sausage manufacture .» *Food Control* 59 (2016): 31-45.
- Casaus**, P, T Nilsen, L.M Cintas, I.F Nes, P.E Herndndez, et H Holo. «Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* TI36 which can act synergistically with enterocin A.» *Microbiol* 143 (1997): 2287-2294 .
- Cascales**, E, et al. «Colicin biology.» *Microbiol Mol l Biol Rev* 71 (2007): 158-229.
- Cavicchioli**, V.Q, et al. «Genetic Diversity and Some Aspects of Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Goat Milk.» *Appl Biochem Biotechno* 175 (2015): 2806-2822.
- Cenatiempo**, Y, J.M Berjeaud, F Biet, et C Fremaux. «Bactériocines de bactéries lactiques : données récentes sur leur structure, leur mode d’action et leurs déterminants génétiques.» *Le Lait* 76 (1996): 169-177.
- Cerning**, J. *Polysaccharides exocellulaires produits par les bactéries lactiques. Dans : Bactéries lactiques. Édité par H De Roissart, & F.M Luquet. Vol. 1. Lorica-Uriage, 1994.*
- Chatterjee**, C, M Paul, L Xie, et W.A Van der Donk. «Biosynthesis and Mode of Action of Lantibiotics .» *Chem Rev* 105 (2005): 633–683.
- Chih-Bo**, H, M Wanna, Z Takeshi, N Jiro, et S Kenji. *Appl Environ Microbiol* 76 (2010): 4542–4545.
- Chikindas**, M.L, et al. «Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells.» *Appl Environ Microbiol* 59 (1993): 3577-3584.
- Cholet**, O. *Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire. Paris : Thèse de Doctorat, Agro Paris Tech, 2006.*
- Cintas**, L. M, P Casaus, L. S Havarstein, P. E Hernandez, and I. F Nes. «Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum» . *Appl Environ Microbiol*.63 (1997): 4321-4330.
- Cintas**, L.M, et al. «Biochemical and Genetic Evidence that *Enterococcus faecium* L50 Produces Enterocins L50A and L50B, the sec-Dependent Enterocin P, and a Novel Bacteriocin Secreted without an N-Terminal Extension Termed Enterocin Q.» *J Bacteriol* 182 (2000): 6806–6814.
- Cintas**, L.M, P Casaus, L.S Havarstein, P.E Hernandez, et I.F Nes. «Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum .» *Appl Environ Microbiol* 63 (1997): 4321-4330.
- Cintas**, L.M, P Casaus, M.F Fernandez, et P.E Herna. «Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria.» *Food Microbiol* 15 (1998): 289-298.
- Claydon**, M.A, S.N Davey, V Edwards-Jones, et V Gordon. «The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry.» *Nat. Biotechnol* 14 (1996): 1584-1586.
- Cocaign-Bousquet**, M, C Garrigues, P Loubière, et N.D Lindley. «Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*.» *Antonie van Leeuw* 70 (1996): 253-267.
- Cogan**, T.M. «Les levains lactiques m'ésophiles.» *Le Lait* 60 (1980): 397-425.
- Commane**, D, R Hughes, C Shortt, et I Rowland. «The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics.» *Mutat Res* 591 (2005): 276-289.
- Cotter**, P, P Ross, et C Hill. «Bacteriocin - a viable alternative to antibiotics ?» *Nature Reviews Microbiology* 11 (2013): 95-105.
- Cotter**, P.D, C Hill, et P Ross. «Bacteriocin: developing innate immunity for food.» *Nature Revies Microbiology* 3 (2005): 777-788.
- Cross**, M.L, L.M Stevenson, et H.S Gill. «Anti-allergy properties of fermented foods: an important immunoregulatory mechanism of lactic acid bacteria?» *Int Immunopharmacol* 1 (2001) : 891–901 .
- Cui**, Y, et al. «Class IIa Bacteriocins: Diversity and New Developments.» *Int J Mol Sci* 13 (2012): 16668-16707.
- Cuozzo**, S. A, F Sesma, J. M Palacios, A. P de Ruiz Holgado, and R. R Raya . «Identification and nucleotide sequence of genes involved in the synthesis of lactocin 705, a two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus casei* CRL 705». *FEMS Microbiol Lett*.185 (2000): 157-161.
- Daba**, H, S Pandian , J.F Gosselin , R.E Simard, J Huang , et C Lacroix . «Detection and Activity of a Bacteriocin Produced by *Leuconostoc mesenteroides*.» *Appl Environ Microbiol* 57 (1991): 3450-3455.
- Daeschel**, M.A, M.C McKenney, et L.C McDonald. «Bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantarum* C11.» *Food Microbiol* 7 (1990): 91–98.
- Dalet**, K, Y Cenatiempo, et P Cossart. «A a54-dependent PTS permease of the mannose family is responsible for sensitivity of *Listeria monocytogenes* to mesentericin Y105.» *Microbiol* 147 (2001): 3263-3269.
- de Ambrosini**, V.M, S Gonzalez, G Perdigon, A.P de Ruiz Holgado, et G Oliver. «Chemical composition of the cell wall of lactic acid bacteria and related species.» *Chem Pharm Bull* 44 (1996): 2263-2267.
- De Arauza**, L.J, A.F Jozalaa, P.G Mazzolab , et T.C.V Penna. «Nisin biotechnological production and application .» *Trends Food Sci Technol* 20 ((2009): 146-154.
- De Vos**, W.M, J.W.M Mulders , R.J Siezen, J Hugenholtz, et O Kuipers. «Properties of nisin Z and distribution of its gene, nisZ, in *Lactococcus lactis*.» *Appl Environ Microbiol* 59 (1993): 213–218.
- De Vuyst** L, MR Foulquié Moreno, and H Revets. “Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins”. *Int J Food Microbiol* 84 (2003): 299– 318
- De Vuyst**, L, et E.J Vandamme. *Antimicrobial Potential of Lactic Acid Bacteria*. Springer US, 1994.

- De Vuyst, L, F Vanderveken, S Van de Ven, et B Degeest.** «Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis.» *J Appl Microbiol* 84 (1998): 1059-1068.
- Deegan, L.H, P.D Cotter, et C Hill.** «Bacteriocins: biological tolls for biopreservation and shelf-life extension.» *Int Dairy J* 16 (2006): 1058-1071.
- Del Campo, R, C Tenorio, R Jiménez-Díaz, C Rubio, R Gómez-Lus, F Baquero, and C Torres.** «Bacteriocin production in vancomycin-resistant and vancomycinsusceptible *Enterococcus* isolates of different origins». *Antimicrob Agents Chemother.*45 (2001): 905-912.
- Dellaglio, F, H de Roissart, S Torriani, M.K Curk, et D Janssens.** *Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In Bactéries Lactiques.* Édité par H Roissart, & F.M Luquet. Paris: Lavoisier, 1994.
- Desmazeaud, M.** "Rôles des cultures de microorganismes dans la flaveur et la texture des produits laitiers fermentés." *Fédération internationale de Laiterie ; Bruxelles (BEL), and Proceeding of the International Dairy Congress Biotechnology-Milk Products*, 1990.
- Devi Sundru, M, et P.M Halami.** «Detection and Characterization of Pediocin PA-1/AcH like Bacteriocin Producing Lactic Acid Bacteria.» *Curr Microbiol* 63 (2011): 181-185.
- Devlieghere, F, L Vermeiren, et J Debevere.** «New preservation technologies: possibilities and limitations.» *Int Dairy J* 14 (2004): 273-285.
- Devoyod J.J, and M. J Lapierre.** La flore microbienne du fromage de Roquefort. IV. - Les entérocoques. Le Lait, INRA Editions, 49 (1969): 637-650.
- Diep, D. B, L Godager, D Brede, and I. F Nes.** «Data mining and characterization of a novel pediocin-like bacteriocin system from the genome of *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745». *Microbiology.*152 (2006): 1649-1659.
- Diep, D.B, et I.F Nes.** «Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria.» *Curr Drug Targets* 3 (2002): 107-122.
- Diep, D.B, L.S Havarstein, et I.F Nes.** «A bacteriocin-like peptide induces bacteriocin synthesis in *Lb. plantarum* C11. .» *Mol Microbiol* 18 (1995): 631-639.
- Diep, D.B, R Myhre, O Johnsborg, A Aakra, et I.F Nes.** «Inducible bacteriocin production in *Lactobacillus* is regulated by differential expression of the pln operons and by two antagonizing response regulators, the activity of which is enhanced upon phosphorylation.» *Mol Microbiol* 47 (2003): 483-494.
- Dirix, G, et al.** «Peptide signal molecules and bacteriocins in Gram-negative bacteria: a genome-wide in silico.» *Peptides* 25 (2004): 1425-1440.
- Dodd, H.M, N Hom, et M.J Giasson.** «Analysis of the genetic determinant for the production of the peptide antibiotic nisin.» *J Gen Microbiol* 136 (1990): 555-566.
- Donnet-Hughes, A, F Rochat, P Serrant, J.M Aeschlimann, et E.J Schiffrin.** «Modulation of nonspecific mechanisms of defense by lactic acid bacteria: effective dose.» *J Dairy Sci* 82 (1999): 863-869.
- Donvito, B, J Etienne, L Denoroy, T Greenland, Y Benito, et Y Vandenesch.** «Synergistic hemolytic activity of *Staphylococcus lugdunensis* is mediated by three peptides encoded by a non-agr genetic locus.» *Infect Immun* 65 (1997): 95-100.
- Dortu, C, and P Thonart.** "Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et." *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 13 (2009): 143-154.
- Dortu, C, et P Thonart.** «Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et.» *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 13 (2009): 143-154.
- Drider, D and S Rebuffat.** *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications.* Springer Science+Business Media, 2011.
- Drider, D, et H Prevost .** *Bactéries lactiques. Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles.* Édité par Economica. paris, 2009.
- Drider, D, et S Rebuffat.** *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications.* 1. Édité par D Drider, & S Rebuffat. Springer Science+Business Media, 2011.
- Drider, D, G Fimland, Y Hechard, L.M McMullen, et H Prevost.** «The continuing story of class IIa bacteriocins.» *Microbiol Mol Biol R* 70 (2006): 564-58.
- Drider, J, et H PREVOST.** *Bactéries lactiques. Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles.* Paris: Economica, 2009.
- Du Toit, M, C.M.A.P Franz, L.M.T Dicks, et W.H Holzapfel.** «Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces .» *J Appl Microbiol* 88 (2000): 482-494.
- Ecker, K.F.** «Bacteriocin and food applications.» *Dairy Food Environ Sanit* 12 (1992): 204-209.
- Eguchi, T, K Kaminaka, J Shima, S Kawamoto, K Mori, S. H Choi, K Doi, S Ohmomo, and S Ogata.** «Isolation and characterization of enterocin SE-K4 produced by thermophilic enterococci, *Enterococcus faecalis* K-4». *Biosci Biotechnol Biochem.*65 (2001): 247-253.
- Eijsink, V.G.H, L Axelsson, D.B Diep, L.S Havarstein, H Holo, et I.F Nes.** «Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication.» *Antonie Van Leeuw* 81 (2002): 639-654.
- Eijsink, V.G.K, M Skeie, P.H Middelhoven, M.B Brurberg, et I.F Nes.** «Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria.» *Appl Environ Microbiol* 64 (1998): 3275-3281.
- El Marnissi, B, R Belkhou, A El oulali lalami, et L Bennani.** «Caractérisation microbiologique et physicochimique du lait cru rt de ses dérivés traditionnels Marocains (Lben et Jben).» *Technologie de Laboratoire* 8 (2013): 100-111.
- Elegadob, F.B, W.J Kim, et D.Y Kwon.** «Rapid purification, partial characterization, and antimicrobial spectrum of the bacteriocin, Pediocin ACM, from *Pediococcus acidilactici* M.» *Intel J Food Microbiol* 37 (I 997): 1-1 1.

- Elotmani**, F, A.M Revol-Junelles , O Assobhei, et J.B Millière . «Characterization of anti-Listeria monocytogenes bacteriocins from Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, and Lactococcus lactis strains isolated from Raïb, a Moroccan traditional fermented milk.» *Curr Microbiol* 44 (2002): 10-7.
- El-Ziney**, M.G, M Uyttendaele, J Debevere, et M Jakobsen. «Characterization of growth and metabolite production of Lb. reuteri during glucose/glycerol cofermentation in batch and continuous cultures.» *Biotechnol Lett* 20 (1998): 913-916.
- Ennahar** , S, et al. «Production of pediocin AcH by Lactobacillus plantarum WHE 92 isolated from cheese.» *Appl Envi Microbiol* 62 (1996): 4381-4387.
- Ennahar** , S, T Sashihara, K Sonomoto, and A Ishizaki . "Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity." *FEMS Microbiol Rev* 24 (2000): 85–106.
- Ennahar**, S, D Aoude-Werner, O Assobhei, et C Hasselmann. «Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by Enterococcus faecium WHE 81 isolated from cheese.» *J Appl Microbiol* 85 (1998b): 521–526.
- Ennahar**, S, O Assobhei, and C Hasselmann. "Inhibition of Listeria monocytogenes in a smear-surface soft cheese by Lactobacillus plantarum WHE 92, a pediocin AcH producer." *J food protection* 2 (1998a): 186-91.
- Ennahar**, S, Y Asou, T Zendo, K Sonomoto, et A Ishizaki. «Biochemical and genetic evidence for production of enterocins A and B by cheese-isolated Enterococcus faecium WHE 81.» *Int. J. Food Microbiol* 70 (2001): 291–301.
- European Economic Community**. «European Economic Community Commission Directive.» *Official J. European Union* 255 (1983): 1–6.
- Falagas** , E.M, I.B Gregoria, et A Stavros . «Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis.» *J Antimicrob Chemother* 58 (2006): 266-272.
- FAO/OMS**. «Consultation mixte d'experts FAO/OMS sur l'évaluation des propriétés sanitaires et nutritionnelles des probiotiques dans les aliments, y compris le lait en poudre contenant des bactéries lactiques vivantes.» Cordoba, Argentine, 2001.
- Farber**, J.M, et P.I Peterkin. «Listeria monocytogenes a food-borne pathogen.» *Microbiol Rev* 55 (1991): 476-511.
- Felix**, J. V, M. A Papatanasopoulos, A. A Smith, A von Holy, and J. W Hastings. « Characterization of leucocin B-Ta11a: a bacteriocin from *Leuconostoc carnosum* Ta11a isolated from meat». *Curr Microbiol*.29 (1994): 207-212.
- Feng**, G, G.K Guron, J.J Churey, et R.W Worobo. «Characterization of mundticin L, a class IIa anti-Listeria bacteriocin from Enterococcus mundtii CUGF08.» *Appl Environ Microbiol* 75 (2009): 5708–5713.
- Ferchichi**, M, J Frere, K Mabrouk, and M Manai. «Lactococin MMFII, a novel class IIa bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* MMFII, isolated from a Tunisian dairy product ». *FEMS Microbiol Lett*.205 (2001): 49-55.
- Fimland**, G, K Sletten, and J Nissen-Meyer. «The complete amino acid sequence of the pediocin-like antimicrobial peptide leucocin C». *Biochem Biophys Res Commun*.295. (2002a): 826-827.
- Fimland**, G, O.R Blingsmo, K Sletten, G Jung, I.F Nes, et J Nissen-Meyer. «New Biologically Active Hybrid Bacteriocins Constructed by Combining Regions from Various Pediocin-Like Bacteriocins: the C-Terminal Region Is Important for Determining Specificity.» *Appl Environ Microbiol* 62 (1996): 3313–3318.
- Fimland**, G, V.G Eijnsink, and J Nissen-Meyer. "Comparative studies of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins ." *Microbiol* 148 (2002): 3661-3670.
- Fimland**, N, P Rogne, G Fimland, J Nissen-Meyer, et P.E Kristiansen. «Three dimensional structure of the two peptides that constitute the two-peptide bacteriocin plantaricin EF.» *Biochim Biophys Acta* 1784 (2008): 1711-1719.
- Fleury**, Y, et al. "Covalent structure, synthesis, and structure-function studies of mesentericin Y 10537, a defensive peptide from Gram-positive bacteria *Leuconostoc mesenteroides*." *J Biol Chem* 271 (1996): 14421-14429.
- Fleury**, Y, M. A Dayem, J. J Montagne, E Chaboisseau, J. P Le Caer, P Nicolas, and A Delfour. «Covalent structure, synthesis, and structure-function studies of mesentericin Y 105(37), a defensive peptide from gram-positive bacteria *Leuconostoc mesenteroides*». *J Biol Chem*.271 (1996): 14421-14429.
- Floriano**, B, J.L Ruiz-Barba, and R Jimenez-Diaz. «Purification and genetic characterization of enterocin I from Enterococcus faecium 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins». *Appl. Environ. Microb.* 64 (1998): 4883-4890
- Flynn**, S, D van Sinderen, G. M Thornton, H Holo, I. F Nes, and J. K Collins. «Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp». *salivarius* UCC118. *Microbiology*.148 (2002): 973-984.
- Foulquié Moreno MR**, P Sarantinopoulos, E Tsakalidou, L De Vuyst. "The role and application of enterococci in food and health". *Int J Food Microbiol* 106(2006): 1 – 24.
- Fox**, P.F, P.L.H McSweeney, et C.M Lynch. « Significance of non-starter lactic acid bacteria in cheddar cheese.» *Aust J Dairy Technol* 53 (1998): 83-89.
- Franz**, C.M.A.P, et al. *Appl Environ Microbiol* 68 (2002): 2550–2554.
- Franz**, C.M.A.P, M.J Van Belkum, W.H Holzapfel, H Abriouel, et A Galvez. «Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme.» *FEMS Microbiol Rev* 31 (2007): 293–310.
- Frederiq**, P. «Sur la pluralité des récepteurs d'antibiose d'E.coli.» *C.R Soc Biol* 140 (1946): 1189-1194.
- Freire**, R. *Proyecto Bioemprende, financiado por el programa POCTEP (Programa de Cooperação Transfronteiraça Espanha-Portugal 2007-13*. Informe Bioconservação de Alimentos, 2010.
- Fujita**, K, S Ichimasa, T Zendo, S Koga, F Yoneyama, J Nakayama, and K Sonomoto. « Structural analysis and characterization of lactacin Q, a novel bacteriocin belonging to a new family of unmodified bacteriocins of Gram - positive bacteria ». *Appl. Environ. Microb.* 73 (2007): 2871-2877
- Gajic**, O, G Buist, M Kojic, L Topisirovic, O.P Kuipers, and J Kok. «Novel mechanism of bacteriocin secretion and immunity carried out by lactococcal multi drug resistance proteins». *J. Biol. Chem* .278 (2003): 34291-34298

- Galvez** , A, G Gallego, M Maqueda, et E Valdivia. «Purification and amino acid composition of peptide antibiotic AS-48 produced by Streptococcus (Enterococcus) faecalis subsp. liquefaciens S-48.» *Antimicro. Agents Chemother* 33 (1989): 437–441.
- Galvez** , A, H Abriouel, R.L Lopez, et N Ben Omar. «Bacteriocin-based strategies for food biopreservation .» *Int J Food Microbiol* 120 (2007): 51–70.
- Galvez** , A, R.L Lopez, H Abriouel, E Valdivia, et N Ben Omar. «Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria.» *Crit Rev Biotechnol* 28 (2008): 125–152.
- Gálvez**, A, H Abriouel, R L Lopez, et N Ben Omar. «Bacteriocin-based strategies.» *Int J Food Microbiol* 120 (2007): 51-70.
- Galvez**, A, M Maqueda, E Valdivia, A Quesada, et E Montoya. «Characterization and partial purification of a broad spectrum antibiotic AS-48 produced by Streptococcus faecalis .» *Can J Microbiol* 32 (1986): 765–771.
- Galvin**, M, C Hill, and R.P Ross. "Lactacin 3147 displays activity in buffer against Gram positive bacterial pathogens which appear insensitive in standard plate assays ." *Lett Appl Microbiol* 28 (1999): 355-358.
- Gamar**, L, K Blondeau, et J.M Simonet. «Physiological approach to extracellular polysaccharide production by Lactobacillus rhamnusus strain C83.» *J APPL MICROBIOL* 83 (1997): 281-287.
- Garneau**, S, N.I Martin, et J.C Vederas. «Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria.» *Biochimie* 84 (2002): 577-592.
- Garnier**, E. «L es secrets du microbiote .» *Le Médecin du Québec* 49 (2014): 10-14.
- Gbassi**, G.K, T Vandamme, S Ennahar, et E Marchioni. «Microencapsulation of Lactobacillus plantarum spp in an alginate matrix coated with whey proteins.» *Int J Food Microbiol* 129 (2009): 103–105.
- Gibson**, L.F, J Woodworth, and A.M George. "Probiotic activity of aeromonas media on the Pacific oyster, Crassostrea gigas, when challenged with Vibrio tubiashii." *Aquaculture* 169 (1998): 111-120.
- Gifford**, I.J, H.N Hunter, et H.J Vogel. «Lactoferricin: A lactoferrin- derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor, and immunological properties.» *Cell Mol Life Sci* 62 (2005): 2588-2598.
- Gilarová**, R, M Voldrich, K Demnerová, M Cerovský, et J Dobiáš. «Cellular fatty acids analysis in the identification of lactic acid bacteria.»
- Gillors** , O, A Etzion, et M.A Riley. «The dual role of bacteriocins as anti and probiotics.» *Appl Microbiol Biotechnol* 81 (2008): 591-606.
- Giraffa**, G. «Enterococci from foods.» *FEMS Microbiol Rev* 26 (2002): 163-171.
- Gonzalez**, C.F, et B.S Kunka. «Plasmid-Associated Bacteriocin Production and Sucrose Fermentation in Pediococcus acidilactici.» *Appl Environ Microbiol* 53 (1987): 2534-2538.
- Gordon**, D.M, et C.L O'Brien. «Bacteriocin diversity and the frequency of multiple.» *Microbiol* 152 (2006): 3239–3244.
- Goulet** , V, C Jacquet , P Martin, V Vaillant, E Laurent, et H de Valk. «Surveillance de la listeriose humaine en France, 2001.» *Bull Epidemiol Hebd* 9 (2004): 33-35.
- Goulet**, V, et P Marchetti. «Listeriosis in 225 non-pregnant patients in 1992: clinical aspects and outcome in relation to predisposing conditions.» *Scand J Infect Dis* 28 (1996): 367-374.
- Goulet**, V, P Jacquet, P Martin , V Vaillant, E Laurent , et H de Valk. «Surveillance of human listeriosis in France, 2001-2003.» *Euro Surveill* 11 (2006): 79-81.
- Gourbeyre**, P, S Denery, et M Bodinier. «Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions.» *J Leukoc Biol* 85 (2011): 685-695.
- Grande-Burgos**, M.J, R.P Pulido, M.D.C López Aguayo, A Gálvez , et R Lucas. «The Cyclic Antibacterial Peptide Enterocin AS-48: Isolation, Mode of Action, and Possible Food Applications.» *Int J Mol Sci* 15 (2014): 22706-22727.
- Gratia**, A. «Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille.» *C. R. Soc Biol* 93 (1925): 1040–1041.
- Gravesen**, A, A.M Jydegaard Axelsen, J Mendes da Silva, T.B Hansen, et S Knochel. «Frequency of bacteriocin resistance development and associated fitness costs in Listeria monocytogenes.» *Appl Environ Microbiol* 68 (2002): 756–764.
- Gravesen**, A, Z Diao, J Voss, B Budde, et S Knochel. «Differential inactivation of L. monocytogenes by D- and L-lactic acid .» *Lett Appl Microbiol* 39 (2004): 528-532.
- Gripon**, J.C, et M Yvon. «Utilisation de cetoacides pour intensifier la flaveur de produits a base de fromage WO 1998048645 A1.» 1998.
- Guangshun**, W, M Biswajit, L Kyle, L Tamara, G Radha, et W Xiuqing. «Antimicrobial Peptides in 2014.» *Pharmaceuticals* 8 (2015): 123-150.
- Guinane**, C.M, P.D Cotter, C Hill, et R.P Ross. «Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food .» *J Appl Microbiol* 98 (2005): 1316-1325.
- Guinane**, C.M, P.D Cotter, E.M Lawton, C Hill, et P Ross. «Insertional mutagenesis to generate lantibiotic resistance in Lc. lactis .» *Appl Environ Microbiol* 73 (2007): 4677- 4680 .
- Guiraud**, J.P. *Microbiologie alimentaire, Techniques d'analyse microbiologiques*. Dunod, 1998.
- Haiping**, L, et D.J O'Sullivan. «Heterologous Expression of the Lactococcus lactis Bacteriocin, Nisin, in a Dairy Enterococcus Strain.» *Appl Environment Microbiol* 68 (2002): 3392–3400.
- Hammi**, I, F Delalande, R Belkhou, E Marchioni, S Cianferani, et S Ennahar. «Maltarin CPN, a new class IIa bacteriocin produced by Carnobacterium maltaromaticum CPN isolated from mold ripened cheese.» *Appl Microbiol* , 2016. Sous presse.
- Hardie**, J.M, et R.A Whiley. «Classification and overview of the genera Streptococcus and Enterococcus .» *J Appl Microbiol Symposium Supplement* 83 (1997): 1-11.
- Hastings**, J. W, M Sailer, K Johnson, K. L Roy, J. C Vederas, and M. E Stiles. «Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*». *J Bacteriol.*173 (1991): 7491-7500.

- Hastings, J.W.**, M Sailer, K Johnson, K.L Roy, J.C Vederas, et M.E Stiles. «Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*.» *J Bacteriol* 173 (1991): 7491-7500 .
- Hauge, H.**, D Mantzilas, V.G Eijsink, et J Nissen-Meyer. «Membranemimicking entities induce structuring of the two-peptide bacteriocins plantaricin E/F and plantaricin J/K.» *J Bacteriol* 181 (1999): 740-747.
- Hauge, H.**, J Nissen-Meyer, I.F Nes, et V.G Eijsink. «Amphiphilic alpha-helices are important structural motifs in the alpha and beta peptides that constitute the bacteriocin lactococcin G--enhancement of helix formation upon alpha-beta interaction.» *Eur J Biochem* 251 (1998): 565-572.
- Haugland , R.P.** *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*. Édité par M.T Spence, & L.D Johnson . Eugene: Molecular Probes, 1996.
- Havarstein, L.S.**, B.D Diep, et I.F Nes. «A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export .» *Mol Microbiol* 16 (1995): 229-240.
- Héchard Y.**, C Pelletier, Y Cenatiempo, et J Frère. «Analysis of σ 54-dependent genes in *Enterococcus faecalis*: a mannose PTS permease (EllMan) is involved in sensitivity to a bacteriocin, mesentericin Y105.» *Microbiol* 147 (2001): 1575-1580.
- Hechard, Y.**, B Derijard, F Letellier, et Y Cenatiempo. «Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*.» *J Gen Microbiol* 138 (1992): 2725-2731.
- Henderson , J.T.**, A.L Chopko, et P.D Van Wassenarr . «Purification and primary structure of Pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1 .O.» *Arch Biochem Biophys* 295 (1992): 5-12.
- Heng , G.**, et M.F Slavik. «Isolation, partial purification and characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain.» *Lett Appl Microbiol* 28 (1999): 363-367.
- Heng, N. C.**, G. A Burtenshaw, R. W Jack, and J. R Tagg. «Ubericin A, a class Iia bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*.» *Appl Environ Microbiol*.73 (2007b): 7763-7766.
- Heng, N.C.K.**, P.A Wescombe, J.P Burton, R.W Jack, et J.R Tagg. *The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria*. Édité par M.A Riley, & M.A Chavan. Berlin: Springer Verlag, 2007.
- Herbin, S.**, F Mathieu, F Brulé, C Branlant, G Lefebvre, et A Lebrihi. «Characteristics and Genetic Determinants of Bacteriocin Activities Produced by *Carnobacterium piscicola* CP5 Isolated from Cheese.» *Curr Microbiol* 35 (1997): 319-326.
- Hessle, C.**, L.A Hanson , et A.E Wold. «Lactobacilli from human gastrointestinal mucosa are strong stimulators of IL-12 production.» *Clin Exp Immunol* 116 (1999): 276-282.
- Hickey, R.M.**, D.P Twomey, R.P Ross, et C Hill. «Production of enterolysin A by a raw milk enterococcal isolate exhibiting multiple virulence factors.» *Microbiol* 149 (2003): 655-64.
- Hilario, C.M.**, et J.B Russell. «Nisin Résistance of *Streptococcus bovis* .» *Appl Environ Microbiol* 67 (2001): 808-813.
- Hirsch, A.**, E Grinstead, H.R Chapman, et A.T.R Mattick. «A note on the inhibition of an anaerobic sporeformer in Swiss-type cheese by a nisin-producing *Streptococcus*.» *J Dairy Sci* 18 (1951): 205-206.
- Holck, A.**, L Axelsson, S. E Birkeland, T Aukrust, and H Blom. «Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706». *J Gen Microbiol*.138 (1992): 2715-2720.
- Hom , N.**, S Swindel, H Dodd, et M Gasson. «Nisin biosynthesis genes are encoded by a novel conjugative transposon.» *Mol Gen Genet* 228 (1991): 129-13.
- Horn, N.**, et al. «Production of Pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis* Using the Lactococcin A Secretory Apparatus.» *Appl Environ Microbiol* 64 (1998): 818-823.
- Howell , T.H.**, J.P Fiorellini, P Blackburn, S.J Projan, J de la Harpe, et R.C Williams. «The effect of a mouthrinse based on nisin, a bacteriocin, on developing plaque and gingivitis in beagle dogs.» *J Clin Periodontol* 20 (1993): 335-339.
- Hu, C.B.**, T Zendo, J Nakayama, et K Sonomoto. «Description of durancin TW-49M, a novel enterocin B-homologous bacteriocin in carrot-isolated *Enterococcus durans* QU 49.» *J Appl Microbiol* 105 (2008): 1364-5072.
- Hu, C.B.**, W Malaphan, T Zendo, J Nakayama, et K Sonomoto. «Enterocin X, a Novel Two-Peptide Bacteriocin from *Enterococcus faecium* KU-B5, Has an Antibacterial Spectrum Entirely Different from Those of Its Component Peptides .» *Appl Environ Microbiol* 76 (2010): 4542-4545.
- Hugas M.**, M Garriga, MT Aymerich. «Functionality of enterococci in meat products”. *Int J Food Microbiol* 88 (2003):223-233.
- Hugenholtz, J.**, et M Kleerebezem. «Metabolic engineering of lactic acid bacteria: overview of the approaches and results of pathway rerouting involved in food fermentations.» *Curr. Opin. Biotechnol* 10 (1999): 492-497.
- Inoue, T.**, H Tomita, and Y Ike. «Bac 32, a novel bacteriocin widely disseminated among clinical isolates of *Enterococcus faecium*”. *Antimicrob Agents Chemother* 50 (2006): 1202-1212.
- Isolauri, E.**, T Arvola, Y Sutas, E Moilanen, et S Salminen. «Probiotics in the management of atopic eczema.» *Clin Exp Allergy* 30 (2000): 1604-1610.
- Izquierdo, E.**, E Marchioni, D Aoude-Werner, C Hasselmann, et S Ennahara. «Smearing of soft cheese with *Enterococcus faecium* WHE 81, a multibacteriocin producer, against *Listeria monocytogenes*.» *Food Microbiol* 26 (2009): 16-20.
- Izquierdo, E.**, et al. "Production of enterocin L50A, L50B, and IT, a new enterocin, by *Enterococcus faecium* IT62, a strain isolated from Italian ryegrass in Japan." *Antimicrob Agents Chemother* 52 (2008): 1917-23.
- Izquierdo, E.** «Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique.» *Tèse de l'Université de Strasbourg*, 2009.
- Jack, R. W.**, J Wan, J Gordon, K Harmark, B. E Davidson, A. J Hillier, R. E Wettenhall, M. W Hickey, and M. J Coventry. «Characterization of the chemical and antimicrobial properties of piscicolin 126, a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* JG126». *Appl Environ Microbiol*.62 (1996): 2897-2903.
- Jack, R.W.**, et al. «Characterization of the Chemical and Antimicrobial Properties of Piscicolin 126, a Bacteriocin Produced by *Carnobacterium piscicola* JG126.» *Appl Environ Microbiol* 62 (1996): 2897-2903.

- Jack, R.W, J.R Tagg, et B Ray.** «Bacteriocins of gram-positive bacteria.» *Microbiol Rev* 59 (1995): 171-200.
- Jiménez-Dfaz, R, R.M Rios-Sánchez, M Desmazeaud, J.L Ruiz-Barba, et J.C Piard.** «Plantaricins S and T, Two New Bacteriocins Produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 Isolated from a Green Olive Fermentation.» *Appl Environ Microbiol* 59 (1993): 1416-1424.
- Joerger, M.C, et T.R Klaenhammer .** «Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin by *Lactobacillus helveticus* 481 .» *J Bacteriol* 167 (1986): 439-446.
- Johnsen , L, G Fimland, V Eijsink, et J Nissen-Meyer .** «Engineering Increased Stability in the Antimicrobial Peptide Pediocin PA-1.» *Appl Environ Microbiol* 66 (2000): 4798-4802.
- Johnsen, L, G Fimland, D Mantzilas, and J Nissen-Meyer.** "Structure-function analysis of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins: C-terminal parts of immunity proteins are involved in specific recognition of cognate bacteriocins." *Appl Environ Microbiol* 70 (2004): 2647-2652.
- Joo, H.S, and M Otto.** "Mechanisms of resistance to antimicrobial peptides in staphylococci." *Biochim Biophys Acta* 1848 (2015): 3055-3061.
- Joo, H.S, et M Otto.** «Mechanisms of resistance to antimicrobial peptides in staphylococci.» *Biochim Biophys Acta* 1848 (2015): 3055-3061.
- Joosten, H.M, E Rodriguez, and M Nunez.** "PCR detection of sequences similar to the AS-48 structural gene in bacteriocin-producing enterococci." *Lett Appl Microbiol* 24 (1997): 40-42.
- Kaiser, A.L, and T.J Montville.** "Purification of the bacteriocin bavaricin MN and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipid vesicles." *Appl Environ Microbiol* 62 (1996): 4529-4535.
- Kalliomaki, M, S Salminen, H Arvilommi, P Kero, P Koskinen, et E Isolauri.** «Probiotics in primary prevention of atopic disease: A randomised placebo-controlled trial.» *Lancet* 357 (2001): 1076-1079.
- Kalmokoff , M, S.K Banerjee, T Cyr, M.A Hefford, et T Gleeson.** «Identification of a new plasmid-encoded sec-dependent bacteriocin produced by *Listeria innocua* 743.» *Appl Environ Microbiol* 67 (2001): 4041-4047.
- Kalmokoff, M. L, S. K Banerjee, T Cyr , M. A Hefford, and Gleeson, T.** «Identification of a new plasmid-encoded sec-dependent bacteriocin produced by *Listeria innocua* 743.» *Appl Environ Microbiol*.67 (2001): 4041-4047.
- Kang, K.H, H.J Shin, Y.H Park, and T.S Lee.** "Studies on the antibacterial substances produced by lactic acid bacteria: purification and some properties of antibacterial substance "Biflong" produced by *B. longum*." *Korean Dairy Sci* 1 (1989): 204-16.
- Kaur, G, T.P Singh, et R.K Malik.** «Antibacterial efficacy of Nisin, Pediocin 34 and Enterocin FH99 against *Listeria monocytogenes* and cross resistance of its bacteriocin resistant variants to common food preservatives .» *Braz J Microbiol* 44 (2013): 63-71.
- Kawamoto, S, et al.** «Biochemical and genetic characterization of mundticin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7393.» *Appl Environ Microbiol* 68 (2002): 3830-3840.
- Kawamoto, S, J Shima, R Sato, T Eguchi, S Ohmomo, J Shibato, N Horikoshi, K Takeshita, and T Sameshima.** «Biochemical and genetic characterization of mundticin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7393.» *Appl Environ Microbiol*.68 (2002): 3830-3840.
- Kelleher, S.L, I Casas, N Carbajal, and B Lönnerdal.** "Supplementation of infant formula with the probiotic *Lactobacillus reuteri* and zinc: impact on enteric infection and nutrition in infant rhesus monkeys." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 35 (2002): 162-168.
- Kemperman, R, M Jonker, A Nauta, O.P Kuipers , and J Kok.** "Functional analysis of the gene cluster involved in production of the bacteriocin circularin A by *Clostridium beijerinckii* ATCC 25752 ." *Appl Environ Microb* 69 (2003): 5839-5848.
- Khaoua , S, N.E El Haloui , et G Lefebvre .** «Caractérisation, purification et détermination de la structure partielle d'une bactériocine de la souche *Lactococcus lactis* C16.» *Actes Inst Agron Veto* 17 (1997): 15-25.
- Kim, Y.M, H.D Paik, and D.S Lee.** "Shelf-life characteristics of fresh oysters and ground beef as affected by bacteriocin-coated plastic packaging film. Journal of the Science of ." *Food Agric* 82 (2002): 998-1002 .
- Kjos, M, I.F Nes, et D.B Diep.** «Mechanisms of Resistance to Bacteriocins Targeting the Mannose Phosphotransferase System.» *Appl Environ Microbiol* 77 (2011): 3335-3342.
- Klaenhammer, T.R, and M.J Kullen.** "Selection and design of probiotics." *Int J Food Microbiol* 50 (1999): 45-57.
- Klaenhammer, T.R, R Barrangou, B Logan Buck, and M.A Azcarate-Peril.** "Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health." *FEMS Microbiol. Rev* 29 (2005): 393-409.
- Klaenhammer, T.R.** "Bacteriocins of lactic acid bacteria." *Biochimie* 70 (1988): 337-349.
- Klaenhammer, T.R.** "Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria." *FEMS Microbiol Rev* 2 (1993): 39-85.
- Klaenhammer, T.R.** «Bacteriocins of lactic acid bacteria.» *Biochimie* 70 (1988): 337-349.
- Klaenhammer, T.R.** «Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria.» *FEMS Microbiol Rev* 2 (1993): 39-85.
- Klein, G, A Pack, C Bonaparte, et G Reuter.** «Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria.» *Int J Food Microbiol* 41 (1998): 103-125.
- Kodani , S, M.E Hudson , M.C Durrant, M.J Buttner, J.R Nodwell, and J.M Willey.** "The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene ramS in *Streptomyces coelicolor*." *Proc Natl Acad Sci* 101 (2004): 11448-11453.
- Kodani , S, M.E Hudson , M.C Durrant, M.J Buttner, J.R Nodwell, et J.M Willey.** «The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene ramS in *Streptomyces coelicolor*.» *Proc Natl Acad Sci* 101 (2004): 11448-11453.
- Kodani, S, M.A Lodato, M.C Durrant, F Picart, et J.M Willey.** «SapT, a lanthionine containing peptide involved in aerial hyphae formation in the streptomycetes.» *Mol Microbiol* 58 (2005): 1368-1380.

- Kojic, M, J Lozo, B Jovcic, I Strahinic, D Fira, et L Topisirovic.** «Construction of a new shuttle vector and its use for cloning and expression of two plasmid-encoded bacteriocins from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8.» *Int J Food Microbiol* 140 (2010): 117–124.
- König, H, et J Fröhlich.** *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine.* Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2009. «*Lactobacillus pentosus* B231 Isolated from a Portuguese PDO Cheese: Production and Partial Characterization of Its Bacteriocin.» *Probiotics Antimicrob Proteins* 6 (2014): 95–104.
- König, H, et J Fröhlich.** *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine.* Édité par Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, 2009.
- Koo, S.P, A.S Bayer, et M.R Yeaman.** «Diversity in antistaphylococcal mechanisms among membrane-targeting antimicrobial peptides.» *Infection and immunity* 69 (2001): 4916–4922.
- Kramer, N.E, S.A Van Hijum, J Knol, J Kok, et O.P Kuipers.** «Transcriptome analysis reveals mechanisms by which *Lc. lactis* acquires nisin resistance.» *Antimicrob Agents Chemother* 50 (2006): 1753–1761.
- Kraus, D, and A Peschel.** "Molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial peptides." *Curr Top microbiol immunol* 306 (2006): 231–250.
- Kuipers, O.P, M.M Beerthuyzen, P.G.G.A De Ruyter, E.J Luesink, et W.M De Vos.** «Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction.» *J Biol Chem* 270 (1995): 27299–27304.
- Larsen, A. G, F. K Vogensen, and J Josephsen.** «Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sourdoughs: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401.» *J Appl Bacteriol.* 75(1993): 113–122.
- Larsen, A.G, F.K Vogensen, et J Josephsen.** «Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: Purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401.» *J Appl Microbiol* 75 (1993): 113–122.
- Lazzarini, A, L Gastaldo, G Candiani, I Ciciliato, et D Losi.** «International Patent Publication No. WO 2005/014628 A1.» 2005.
- Le Marrec, C, B Hyronimus, P Bressollier, B Verneuil, and M. C Urdaci.** «Biochemical and genetic characterization of coagulins, a new anti listerial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins, produced by *Bacillus coagulans* I(4)» *Appl Environ Microbiol.* 66 (2000): 5213–5220.
- Le Marrec, C, B Hyronimus, P Bressollier, B Verneuil, et M.C Urdaci .** «Biochemical and genetic characterization of coagulins, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins, produced by *Bacillus coagulans* I4.» *Appl Environ Microbiol* 66 (2000): 5213–5220.
- Lechardeur, D, et al.** «Using heme as an energy boost for lactic acid bacteria.» *Curr Opin Biotechnol* 22 (2011): 143–9.
- Leroy, F, T De Winter, T Adriany, P Neysens, et L De Vuyst .** «Sugars relevant for sourdough fermentation stimulate growth of and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471.» *Int J Food Microbiol* 112 (2006): 102–111.
- Leveau J.Y, and M Bouix.** (1993) *Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel*, edited by Tec & Doc (Lavoisier. Paris), pp. 85–87.
- Li, H, and D.J O'Sullivan.** "Identification of a *nisI* promoter within the *nisABC* operon that may enable establishment of nisin immunity prior to induction of the operon via signal transduction." *J Bacteriol* 188 (2006): 8496–8503.
- Lili, X, and W.A Van Der Donk.** "Post-translational modifications during lantibiotic biosynthesis ." *Curr Opin Chem Biol* 8 (2004): 498–507.
- Lili, X, et W.A Van Der Donk.** «Post-translational modifications during lantibiotic biosynthesis.» *Curr Opin Chem Biol* 8 (2004): 498–507.
- Liu, S.** «Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations.» *Int J Food Microbiol* 83 (2003): 115–131.
- Lohans, C.T, et al.** "Solution structures of the linear leaderless bacteriocins enterocin 7A and 7B resemble carnocyclin A, a circular antimicrobial peptide." *Biochemistry* 52 (2013): 3987–94.
- Lozo, J, B Jovcic, M Kojic, et L Topisirovic.** «Molecular Characterization of a Novel Bacteriocin and an Unusually Large Aggregation Factor of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8, a Natural Isolate from Homemade Cheese.» *Curr Microbiol* 55 (2007): 266–271.
- Luque, F.M, G Corrieu, et P Marteau.** «Bactéries lactiques et probiotiques.» *Acta Endoscopica* (Acta Endoscopica) 36 (2006): 376–376.
- Maldonado, A, B Caballero-Guerrero, E Jimenez, R Jiménez-Díaz, J. L Ruiz-Barba, and J. M Rodriguez.** «Enterocin C, a class IIb bacteriocin produced by *E. faecalis* C901, a strain isolated from human colostrum.» *Int J Food Microbiol.* 133 (2009): 105–112.
- Maldonado, A, J. L Ruiz-Barba, and R Jimenez-Diaz.** «Purification and genetic characterization of plantaricin NC8, a novel co-culture-inducible two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8.» *Appl Environ Microbiol.* 69 (2003): 383–389.
- Maldonado-Barragán, A, B Caballero-Guerrero, E Jiménez, R Jiménez-Díaz, J.L Ruiz-Barba, et J.M Rodríguez.** «Enterocin C, a class IIb bacteriocin produced by *E. faecalis* C901, a strain isolated from human colostrum.» *Int J Food Microbiol* 133 (2009): 105–112.
- Malheiros, P.S, I.M Cuccovia, and B.D.G.M Franco.** "Inhibition of *Listeria monocytogenes* in vitro and in goat milk by liposomal nanovesicles containing bacteriocins produced by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a." *Food Control* 63 (2016): 158–164.
- Malini, M, et J Savitha .** «Heat stable bacteriocin from *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* isolated from locally available cheese: An in vitro study.» *J Biotechnol Pharm Res* 3 (2012): 28–41.
- Marciset, O, M. C Jeronimus-Stratingh, B Mollet, and B Poolman.** «Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin, that functions without a receptor.» *J Biol Chem.* 272 (1997): 14277–14284.

- Margaret, A.R.**, et E.W John . «BACTERIOCINS: Evolution, Ecology, and Application.» *Annu Rev Microbiol* 56 (2002): 117-137.
- Marth, E.H.**, and J.L Steele. *Applied dairy microbiology*. 2e. Edited by Marcel Dekker. New York, 2001.
- Martinez, R.C.R.**, et al. "Bacteriocin production and inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a in a potentially symbiotic cheese spread ." *Food Microbiol* 48 (2015): 143-152.
- Martin-Visscher, L.A.**, et al. «Isolation and Characterization of Carnocyclin A, a Novel Circular Bacteriocin Produced by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307.» *Appl Environ Microbiol* 74 (2008): 4756-4763.
- Marugg, J. D.**, C. F Gonzalez, B. S Kunka, A. M Ledebor, M. J Pucci, M. Y Toonen, S. A Walker, L. C Zoetmulder, and P Vandenberg. «A Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, and bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0.» *Appl Environ Microbiol*.58. (1992): 2360-
- Marugg, J.D.**, et al. «Cloning expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0.» *Appl Environ Microbiol* 58 (1992): 2360-2367.
- Mattick , A.T.R.**, et A Hirsch. «Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci.» *Lancet* 2 (1947): 5-7.
- Mauriello, G.** D Ercolini, A La Storia, A Casaburi, et F Villani. «Development of polythene films for food packaging activated with an antilisterial bacteriocin from *Lactobacillus curvatus* 32Y.» *J Appl Microbiol* 97 (2004): 314-322.
- Mazzotta, A.S.**, A.D Crandall, and T.J Montville. "Nisin résistance in *Clostridium botulinum* spores and végétative cells ." *Appl Environ Microbiol* 63 (1997): 2654-2659.
- McAuliffe, O.** T O'Keeffe, C Hill, and R.P Ross. "Regulation of immunity to the two-component lantibiotic, lactacin 3147, by the transcriptional repressor LtnR." *Mol Microbiol* 39 (2001): 982-993.
- McCormick, J. K.**, A Poon, M Sailer, Y Gao, K. L Roy, L. M McMullen, J. C Vederas, M. E Stiles, and M. J Van Belkum. «Genetic characterization and heterologous expression of brochocin-C, an antibotulinal, two-peptide bacteriocin produced by *Brochothrix campestris* ATCC 43754.» *Appl Environ Microbiol* 64 (1998): 4757-4766.
- McLeod, A.** O.L Nyquist, L Snipen, K Naterstad, and L Axelsson. "Diversity of *Lactobacillus sakei* strains investigated by phenotypic and genotypic methods." *Syst Appl Microbiol* 31 (2008): 393-403.
- Métivier, A.** M. F Pilet, X Dousset, O Sorokine, P Anglade, M Zagorec, J. C Piard, D Marion, Y Cenatiempo, and C Fremaux. «Divercin V41, a new bacteriocin with two disulphide bonds produced by *Carnobacterium divergens* V41: primary structure and genomic organization» . *Microbiology* 144 (1998): 2837-2844.
- Milles, S.** I.C Stanton, C Hill, and R.P Ross. "New Developments and Applications of Bacteriocins and Peptides in Foods." *Annu. Rev. Food Sci. Technol* 2 (2011): 299-329.
- Moll, G.**, et al. «Lactococcin G is a potassium ionconducting, two-component bacteriocin.» *J Bacteriol* 178 (1996): 600-605.
- Moll, G.** H Hildeng-Hauge, J Nissen-Meyer, I.F Nes, W.N Konings, and A.J Driessen. "Mechanistic properties of the two-component bacteriocin lactococcin G." *J Bacteriol* 180 (1998): 96-99.
- Moll, G.N.** W.N Konings, and A.J.M Driessen. "Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation." *Anton Leeuw J* 3 (1999): 185-195.
- Montalban-Lopez, M.** et al. «Characterization of linear forms of the circular enterocin AS-48 obtained by limited proteolysis.» *FEBS Letters* 582 582 (2008): 3237-3242.
- Montalbán-López, M.** M Sánchez-Hidalgo, R Cebrián, et M Maqueda. «Discovering the bacterial circular proteins: bacteriocins, cyanobactins, and pilins.» *J Biol Chem* 287 (2012): 27007-27013.
- Montville , T.J.** and K Winkowski. *Biologically based preservation systems and probiotic bacteria*. Washington: In Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, 1997.
- Montville, T.J.** and Y Chen. "Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions ." *Appl Microbiol Biotechnol* 50 (1998): 511-519.
- Moraes, M.P.** L.M Perin, M.B.T Ortolani, A.K Yamazi, G.N Viçosa, and L.A Nero. "Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic." *Food Sci. Technol* 43 (2010): 1320-1324.
- Moussaoui, W.** C Bouakaze , et G Prevost . «Application de la spectrographie de masse MALDI-TOF à l'identification bactérienne.» *Bull.Soc.Fr.Microbiol* 24 (2009): 293-301.
- Mozzi, F.** R.R Raya, and G.M Vignolo. *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications*. Singapore: Blackwell publishing, 2010.
- Muñoz, A.**, et al. "Inhibition of *Staphylococcus aureus* in dairy products by enterocin AS-48 produced in situ and ex situ: Bactericidal synergism with heat." *Int Dairy J* 17 (2007): 760-769.
- Naghmouchi , K.** E Kheadr, C Lacroix, and I Fliss. "Class I/ class IIa bacteriocin crossresistance phenomenon in *L. monocytogenes*." *Food Microbiol* 24 (2007): 718-727.
- Naghmouchi, K.** I Fliss, D Drider, et C Lacroix. «Pediocin PA-1 production during repeated-cycle batch culture of immobilized *Pediococcus acidilactici* UL5 cells.» *J Biosci Bioeng* 105 (2008): 513-517.
- Nair, L.S.** et C.T Laurencin. «Biodegradable polymers as biomaterials.» *Prog Polymer Sci* 32 (2007): 762-798.
- Narsaiah, K.**, et al. «Effect of bacteriocin incorporated alginate coating on shelf-life of minimally processed papaya (*Carica papaya* L.)» *Postharvest Biol Technol* 100 (2015): 212-218.
- Nes, I. F.**, S.S Yoon1, et D.B Diep. «Ribosomally Synthesiszed Antimicrobial Peptides (Bacteriocins) in Lactic Acid Bacteria.» *Review Food Sci Biotechnol* 16 (2007): 675-690 .
- Nes, I.F.** D.B Diep, L.S Havarstein, M.B Brurberg, V Eijsink, and H Holo. "Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria." *Int J Gen Mol Microbiol* 70 (1996): 113-128.
- Nettles, C.G.** and S.F Barefoot. "Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria." *J Food Prot* 56 (1993): 338-356.
- Netz, D.J.** H.G Sahl, R Marcelino, J dos Santos Nascimento, S.S de Oliveira, M.B Soares, and M do Carmo de Freire Bastos. «Molecular characterisation of aureocin A70, a multi-peptide bacteriocin isolated from *Staphylococcus aureus*». *J. Mol. Biol* 311 (2001): 939-949

- Netz, D.J, R Pohl, A.G Beck-Sickinger, T Selmer, A.J Pierik, M.d. o.C Bastos, and H.G Sahl.** «Biochemical characterisation and genetic analysis of aureocin A53, a new, atypical bacteriocin from *Staphylococcus aureus*». *J. Mol. Biol.* 319 (2002): 745-756
- Nicholls, D.J, and S.J Ferguson.** *Bioenergetics: Chemiostatic energy transduction.* 2. Edited by D.G Nicholls, & S.J Ferguson. London: Académie Press, 1992.
- Nissen-Meyer, J, P Rogne, C Oppedgård, H.S Haugen, and P.E Kristiansen.** "Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria." *Curr Pharm Biotechnol* 10 (2009): 19-37.
- Nissen-Meyer, J, H Holo, L.S Håvarstein, K Sletten, et I.F Nes.** «A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides.» *J Bacteriol*, 1992: 5686-5692.
- O'Connor, P.M, et al.** "Nisin H Is a New Nisin Variant Produced by the Gut-Derived Strain *Streptococcus hyointestinalis* DPC6484." *Appl Environ Microbiol* 81 (2015): 3953-3960.
- Oppedgård, C, G Fimland, J.H Anonsen, et J Nissen-Meyer.** «The Pediocin PA-1 Accessory Protein Ensures Correct Disulfide Bond Formation in the Antimicrobial Peptide Pediocin PA-1.» *Biochem* 54 (2015): 2967-2974.
- Oppedgård, C, P Rogne, L Emanuelsen, P.E Kristiansen, G Fimland, and J Nissen-Meyer.** "The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action." *J Mol Microbiol Biotechnol* 13 (2007): 210-219.
- Oppedgård, C, P Rogne, P.E Kristiansen, and J Kristiansen.** "Structure analysis of the two-peptide bacteriocin lactococcin G by introducing D-amino acid residues." *Microbiol* 156 (2010): 1883-1889.
- Papathanasopoulos, M.A, et al.** «Multiple bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* TA33a and other *Leuconostoc/Weissella* strains.» *Curr Microbiol* 35 (1997): 331-335.
- Patrzykat, A, C.L Friedrich, L Zhang, V Mendoza, and R.E Hancock.** "Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*." *Antimicrob Agents Chemother* 46 (2002): 605-614.
- Patton, G.C, and W.A Van Der Donk.** "New developments in lantibiotic biosynthesis and mode of action." *Curr Opin Microbiol* 8 (2005): 543-551.
- Penner, R, R.N Fedorak, and K.L Madsen.** "Probiotics and nutraceuticals: nonmedicinal treatments of gastrointestinal diseases." *Curr Opin Pharmacol* 5 (2005): 596-603.
- Perez, R.H, et al.** «Monitoring of the multiple bacteriocin production by *Enterococcus faecium* NKR-5-3 through a developed liquid chromatography and mass spectrometry-based quantification system.» *J Bioscie Bioeng* 114 (2012): 490-496.
- Perez, R.H, T Zendo, and K Sonomoto.** "Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications." *Microb Cell Fact* 13 (2014): (Suppl1).
- Peschel, A, and H.G Sahl.** "The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance." *Nat Rev Microbiol* 4 (2006): 529-536.
- Peschel, A.** "How do bacteria resist human antimicrobial peptides? ." *Trends in microbiology* 10 (2002): 179-186.
- Pfeiler, E.A, and T.R Klaenhammer.** "The genomics of lactic acid bacteria." *TRENDS MICROBIOL* 15 (2007): 546-553.
- Piard, J.C, et M Desmazeaud.** «Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1.» *Lait* 71 (1991): 525 - 541.
- Piper, C, C Hill, P.D Cotter, and R.P Ross.** "Bioengineering of a Nisin A-producing *Lactococcus lactis* to create isogenic strains producing the natural variants Nisin F, Q and Z." *Microb Biotechnol* 4 (2011): 375-382.
- Pons, A.M, I Lanneluc, G Cotteceau, and S Sable.** "New developments in non-post translationally modified microcins." *Biochimie* 84 (2002): 531-537.
- Pridmore, D, N Rekhif, A.C Pittet, B Suri, and B Mollet.** "Variacin, a new lanthionine-containing bacteriocin produced by *Micrococcus varians*: comparison to lactacin 481 of *Lactococcus lactis*." *Appl Environ Microbiol* 62 (1996): 1799-1802.
- Pridmore, R. D, B Berger, F Desiere, D Vilanova, C Barretto, A. C Pittet, M. C Zwahlen, M Rouvet, E Altermann, R Barrangou, B Mollet, A Mercenier, T Klaenhammer, F Arigoni, and M. A Schell.** «The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533». *Proc Natl Acad Sci US A.*101 (2004): 2512-2517.
- Qi, F, P Chen, and P. W Caufield.** «The group I strain of *Streptococcus mutans*, UA140, produces both the lantibiotic mutacin I and a nonlantibiotic bacteriocin, mutacin IV». *Appl Environ Microbiol.*67 (2001): 15-21.
- Quadri, L.E.N, L.Z Yan, M.E Sales, and J.C Vederas.** " Effect of amino acid substitutions on the activity of carnobacteriocin B2. Overproduction of the antimicrobial peptide, its engineered variants, and its precursor in *Escherichia coli*. J." *Biol Chem* 272 (1997): 3384-3388.
- Quadri, L.E.N, M Sailer, K.L Roy, J.C Vederas, et M.E Stiles.** «Chemical and Genetic Characterization of Bacteriocins Produced by *Carnobacterium piscicola* Za LV17B .» *J Biol Chem* 269 (1994): 12204-12211.
- Quiberoni, A, L Rezaiki, M El Karoui, I Biswas, P Tailliez, and A Gruss.** "Distinctive features of homologous recombination in an 'old' microorganism, *Lactococcus lactis*." *Res Microbiol* 152 (2001): 131-139.
- Ramnath, M, S Arous, A Gravesen, J.W Hastings, and Y Hécharde.** "Expression of mptC of *Listeria monocytogenes* induces sensitivity to class IIa bacteriocins in *Lactococcus lactis* ." *Microbiol* 150 (2004): 2663-2668.
- Raynaud, S.** «Régulation, métabolisme et Transcriptionnelle de l'auto-acidification chez *Lactococcus Lactis*.» 2006.
- Reddy Y, K.V, C ARANHA, S.M GUPTA, et R.D YEDERY.** «Evaluation of Antimicrobial Peptide Nisin as a Safe Vaginal Contraceptive Agent in Rabbits: In Vitro and In Vivo Studies.» *Reproduction* 128 (2004): 117-126.
- Rev Toxicol Maroc N° 6 - 3ème trimestre.** "Publication officielle du Centre Anti Poison du Maroc Ministère de la santé." 2010.
- Ricciardi, A, and F Clement.** "Exopolysaccharides from lactic acid bacteria : Structure, production and technological applications." *ITAL J FOOD SCI* 12 (2000): 23-45.

- Richard** , C, R Canon , K Naghmouchi , D Bertrand , H Prevost, et D Drider . «Evidence on correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class IIa bacteriocins.» *Food Microbiol* 23 (2005): 175-183.
- Richards**, R.C, D.B O'Nei, P Thibault, and K.V Ewart . "Histone H1: An antimicrobial protein of Atlantic salmon (*Salmo salar*)." *Biochem Biophys Res Co* 284 (2001): 549-555.
- Roberts**, C.M, W.F Fett, S.F Osman, C Wijey, J.V O'Connor , et D.G Hoover . «Exopolysaccharides production by *Bifidobacterium longum* BB-79.» *J APPL BACTERIOL* 78 (1995): 463-468.
- Robichon**, D, E Gouin, M Débarbouillé, P Cossart, Y Cenatiempo, et Y Héchard. «The rpoN (a 54) gène from *Listeria monocytogenes* is involved in résistance to mesentericin Y105, an antibacterial peptide from *Leuconostoc mesenterivide*.» *J Bacteriol* 179 (1997): 7591-7594.
- Rocourt**, J. «*Listeria monocytogenes* : l'état de la science. In Comptes rendus de la Troisième conférence internationale « Asept Sécurité Alimentaire 94 ».» Édité par A Amgar. Laval, 1994. 233-242.
- Rodriguez**, E, M.I Martinez, N Horn, and H.M Dodd. "Heterologous production of bacteriocins by Lactic Acid Bacteria." *Int J Food Microbiol* 80 (2003): 101-116.
- Rodriguez**, J.M, M.I Martinez, and J Kok. "Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria." *Crit Rev Food Sci Nutr* 42 (2002): 91-121.
- Rogers**, L.A. "The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*". *J. Bacteriol* 5 (1928): 161-168.
- Rogne** , P, C Haugen, G Fimland, J Nissen-Meyer, et P.E Kristiansen. «Three-dimensional structure of the two-peptide bacteriocin plantaricin JK.» *Peptides* 30 (2009): 1613-1621.
- Rogne**, P, G Fimland, J Nissen-Meyer, and P.E Kristiansen. "Three-dimensional structure of the two peptides that constitute the two-peptide bacteriocin lactococcin G." *Biochim Biophys Acta* 1784 (2008): 543-554.
- Ross**, R.P, C Stanton, G.F Fitzgerald, and A Coffey. "Novel cultures for cheese improvement." *Trends Foods Sci Technol* 11 (2000): 96-104.
- Ross**, R.P, S Morgan, et C Hill. «Preservation and fermentation: past, present and.» *Int J Food Microbiol* 79 (2002): 3-16.
- Roussel**, S, et al. "Surveillance des *Listeria monocytogenes* dans les aliments." *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation no 50/Spécial Risques alimentaires microbiologiques* , 2013.
- Rowland**, I. "Probiotics and colorectal cancer risk." *Br J Nutr* 91 (2004): 805-807.
- Ruas**, M.P, and G.C De Los Reyes. "Methods for the screening, isolation and characterization of exopolysaccharides produced by Lactic Acid Bacteria." *J Dairy Sci* 88 (2005): 843-856.
- Saarela**, M, G Mogensen, R Fondén, J MättöJ, and T Mattila-Sandholm. "Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties." *J Biotechnol* 84 (2000): 197-215.
- Salminen**, S, A.V WRIGHT, and A OUWEHAND. *Lactic acid bacteria microbiological and functional aspects*. Edited by Marcel Dekker. 2004.
- Samyn**, B, et al. «The cyclic structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48.» *FEBS Letters* 352 (1994): 87-90.
- Sánchez**, J, D. B Diep, C Herranz, I. F Nes, L. M Cintas, and P. E Hernández. «Amino acid and nucleotide sequence, adjacent genes, and heterologous expression of hiracin JM79, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*)». *FEMS Microbiol Lett.* 270 (2007): 227-
- Sánchez-Hidalgo**, M, M Maqueda, A Gálvez, H Abriouel, E Valdivia, and M Martínez-Bueno. «The genes coding for enterocin EJ97 production by *Enterococcus faecalis* EJ97 are located on a conjugative plasmid». *Appl. Environ Microb.* 69 (2003): 1633-1641
- Sass**, P, A Jansen, C Szekat, V Sass, H.G Sahl, and G Bierbaum. "The lantibiotic mersacidin is a strong inducer of the cell wall stress response of *Staphylococcus aureus* ." *BMC Microbiol* 8 (2008): 186.
- Schell** , M.A, et al. "The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002): 14422-14427.
- Schillinger**, U, R Geisen, and W.H Holzapfel. "Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods ." *Trends Food Sci Technol* 71 (1996): 58-64.
- Schindler**, C.A, and V.T Schuhardt. "Lysostaphin: A new bacteriolytic agent for the *Staphylococcus*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 51 (1964): 414-421.
- Schöbitz** , R, V Suazo, M Costa, and L Ciampi. "Effects of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Carnobacterium piscicola* against human and salmon isolates of *Listeria monocytogenes*." *Int J Food Microbiol* 84 (2003): 237-244.
- Seksik**, P. "Probiotiques et maladies inflammatoires chroniques intestinales." *Cah Nutr Diet* 42 (2007): 51-59.
- Settanni**, L, and A Corsetti. "Application of bacteriocins in vegetable food." *Int J Food Microbiol* 121 (2008): 123-138.
- Siezen**, R.J, O.P Kuipers, and W. M de Vos. «Comparison of lantibiotic gene clusters and encoded proteins». *Anton. Van Leeuw.* 69 (1996): 171-184
- Simon**, G.L, and S.L Gorbach. *Intestinal flora and gastro-intestinal function*. Edited by L.R Johnson. New York: Raven Press, 1987.
- Simon**, L, C Fremaux, Y Cenatiempo, and J. M Berjeaud. «Sakacin g, a new type of antilisterial bacteriocin». *Appl Environ Microbiol.* 68 (2002): 6416-6420.
- Simon**, L. "Protection des matrices alimentaires par antagonisme bactérien." *Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées. Poitiers*, 2001.
- Skaugen** , M, L Cintas, and I.F Nes. *Genetics of bacteriocin production in lactic acid bacteria. Vol. 3, pp. 225-249. In: Genetic of Lactic Acid Bacteria*. Edited by BJB Wood , & P.J Warner. London: Plenum Publishers, 2003.
- Skaugen** , M, L Cintas, et I.F Nes. *Genetics of bacteriocin production in lactic acid bacteria. Vol. 3, pp. 225-249. In: Genetic of Lactic Acid Bacteria*. Édité par BJB Wood , & P.J Warner. London: Plenum Publishers, 2003.
- Smoragiewicz**, w, M Bielecka, A Babuchowski, A Boutard, et H Dubeau. «Les probiotiques.» *Can J Microbiol* 39 (1993): 1089-1095.

- Snoep, J.L., M.J Teixeira de Mattos, M.J Starrenburg, et J Hugenholtz.** «Isolation, characterization, and physiological role of the pyruvate dehydrogenase complex and alphaacetylactate synthase of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis*. » *J Bacteriol* 174 (1992): 4838-4841.
- Steen, M.T., Y.J Chung, and J.N Hansen.** "Characterization of the nisin gene as part of a polycistronic operon in the chromosome of *Lactococcus lactis* ATCC 11434 ." *Appl Environ Microbiol* 57 (1991): 1181-118.
- Stein, T, S Heinzmann, I Solovieva, and K.D Entian.** "Function of *Lc. lactis* nisin immunity genes *nisI* and *nisFEG* after coordinated expression in the surrogate host *Bacillus subtilis* ." *J Biol Chem* 278 (2003): 89-94.
- Stephens, S. K, B Floriano, D. P Cathcart, S. A Bayley, V. F Witt, R Jiménez-Díaz, P. J Warner, and J. L Ruiz-Barba.** «Molecular analysis of the locus responsible for production of plantaricin S, a two-peptide bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10». *Appl Environ Microbiol*.64 (1998): 1871-1877.
- Stern, N.J, et al.** "Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system." *Antimicrob Agents Chemother* 50 (2006): 3111-3116.
- Stiles, M.E, and W.H Holzapfel.** "Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy." *Int J Food Microbiol* 36 (1997): 1–29.
- Stiles, M.E.** "Biopreservation by lactic acid bacteria." *Antonie van Leeuw* 70 (1996): 331-340.
- Strus, M, T Gosiewski, P Kochan, and P.B Heczko.** "The in vitro effect of hydrogen peroxide on vaginal microbial communities." *FEMS Immuno. Medical Microbiol* 48 (2006): 56- 63.
- Swaminathan, B, and P Gerner-Smidt.** "The epidemiology of human listeriosis." *Microbes Infect* 9 (2007): 1236-1243.
- Swe, P.M, G.M Cook, J.R Tagg, et R.W Jack.** «Mode of action of dysgalacticin: a large heat-labile bacteriocin.» *J Antimicrob Chemother* 63 (2009): 679–686.
- Tagg, J.R, and L.W Wannamaker.** "Genetic basis of streptococcal A-FF22 production." *Antimicrob Agents Chemother* 10 (1976): 299-306.
- Tahiri, I, M Desbiens , R Benech, E Kheadr, C Lacroix, S Thibault, D Ouellet, and I Fliss.** «Purification, characterization and amino acid sequencing of divergicin M35: a novel class IIa bacteriocin produced by *Carnobacterium divergens* M35». *Int J Food Microbiol*.97 (2004): 123-136.
- Tanous, C, A Gori, L Rijnen, E Chambellon, and M Yvon.** "Pathways for α -ketoglutarate formation in *Lactococcus lactis* and their role in amino acid catabolism." *Int. Dairy J* 15 (2005): 759-770.
- Tanous, C, E Chambellon, D Le Bars, G Delespaul, and M Yvon.** "Glutamate dehydrogenase activity can be transmitted naturally to *Lactococcus lactis* strains to stimulate amino acid conversion to aroma compounds." *Appl Environ Microbiol* 72 (2006): 1402–1409.
- Tanous, C, S Kieronczyk, E Helinck, E Chambellon, et M Yvon.** «Glutamate dehydrogenase activity: a major criterion for the selection of flavour-producing lactic acid bacteria strains.» *ANTON LEEUW J* 82 (2002): 271-278.
- Tantaoui El Araki, A.** «Biotechnologie et Agro-alimentaire au Maroc.» Casablanca, 2005
- Tari, M.** «Les listérioses humaines. Image de la forme maternofoetale (Thèse).» Rabat-Maroc , 1981.
- Tattevin , P, A Lorchach, and M Revest .** "Innovative treatments for multidrug-resistant bacteria ." *Bull Acad Natle Méd* 198 (2014): 439-457.
- Taylor, G.D, P Kibsey, T Kirkland, E Burroughs, and E Tredget.** "Predominance of staphylococcal organisms in infections occurring in a burns intensive care unit ." *Burns* 18 (1992): 332-335.
- Tessema, G.T, T Moretro, A Kohler, L Axelsson, et K Naterstad.** «Complex phenotypic and genotypic responses of *Listeria monocytogenes* strains exposed to the class IIa bacteriocin sakacin P .» *Appl Environ Microbiol* 75 (2009): 6973–6980.
- Thompson , J, and C.R Gentry-Weeks.** *Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. Dans : Bactéries lactiques.* Edited by H De Roissart , & F.M Luquet. Vol. I. Lorica, 1994.
- Tichaczek, P. S, R. F Vogel, and W. P Hammes.** «Cloning and sequencing of *sakP* encoding sakacin P, the bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* LTH 673». *Microbiology*.140 (1994): 361-367.
- Tichaczek, P. S, R. F Vogel, and W. P Hammes.** «Cloning and sequencing of *curA* encoding curvacin A, the bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* LTH1174». *Arch Microbiol*.160 (1993): 279-283.
- Tichaczek, P.S, J Nissenmeyer , I.F Nes, R.F Vogel , and W.P Hammes.** "haracterization of the bacteriocins curvacin-a from *Lactobacillus curvatus* Lth1174 and sakacin-P from *Lb. sake* Lth673." *Syst Appl Microbiol* 15 (1992): 460-468.
- Tichaczek, P.S, R.F Vogel, et W.P Hammes.** «Cloning and sequencing *sakP* encoding sakacin P, the bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* LTH673.» *Microbiol* 140 (1994): 361–367.
- Tomita, H, S Fujimoto, K Tanimoto, and Y Ike.** «Cloning and genetic organization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromoneres ponsive conjugative plasmid pYI17». *J Bacteriol*.178 (1996): 3585-3593.
- Topisirovic, L, M Kojic, D Fira, N Golic, I Strahinic, et J Lozo.** «Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation .» *Int J Food Microbiol* 112 (2006): 230–235.
- Tormo , H.** «Diversité des flores microbiennes du lait crus de chèvre et facteurs de variabilité.» Thèse du doctorat, 238 pages, Toulouse, 2010.
- Tourdjman, M, E Laurent, and A Leclercq.** "Listériose humaine : une zoonose d'origine alimentaire." *Revue Francophone des Laboratoires: Zoonoses* 2014 (2014): 37-44.
- Touré, R, E Kheadr, C Lacroix, O Moroni, and I Fliss.** "Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*." *J Appl Microbiol* 95 (2003): 1058–1069.
- Tulini, F.L, et al.** «Purification and characterization of antimicrobial peptides from fish isolate *Carnobacterium maltaromaticum* C2: Carnobacteriocin X and carnolysins A1 and A2.» *Int J Food Microbiol* 173 (2014): 81–88.
- Twomey, D, M Ryan, B Meaney, and C Hill.** "Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications ." *Anton Van Leeuw* 82 (2002): 165-185.
- Ueda, K, et al.** "AmfS, an extracellular peptidic morphogen in *Streptomyces griseus*." *J Bacteriol* 184 (2002): 1488–1492.

- Vadyvaloo**, V, J.L Snoep, J.W Hasting, and M Rautenbach. "Physiological implications of class IIa bacteriocin resistance in *L. monocytogenes* strains ." *Microbiol* 150 (2004): 335-340 .
- Valdés-Stauber** , N, and S Scherer. "Isolation and characterization of Linocin M18, a bacteriocin produced by *Brevibacterium linens*." *Appl Environ Microbiol* 60 (1994): 3809–3814.
- Van Belkum**, M.J, L.A Martin-Visscher, et J.C Vederas. «Structure and genetics of circular bacteriocins .» *Trends Microbiol* 19 (2011): 411-418.
- Van de Venet** , F.J, H.W Van den Hooven, R.N Konings, and C.W Hilbers. "NMR studies of lantibiotics. The structure of nisin in aqueous solution ." *European journal of biochemistry / FEBS* 202, 1991: 1181-1188.
- Van Reenen**, C.A, L.M.T Dicks, et M.L Chikindas. «Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*.» *J Appl Microbiol* 84 (1998): 1131–1137.
- Van Reenen**, C.A, M.L Chikindas, W.H Van Zyl, et L.M.T Dicks . «Characterization and heterologous expression of a class IIa bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*.» *Int J Food Microbiol* 81 (2002): 29–40.
- Van Reenen**, C.A, W.H Van Zyl, et L.M.T Dicks. «Expression of the Immunity Protein of Plantaricin 423, Produced by *Lactobacillus plantarum* 423, and Analysis of the Plasmid Encoding the Bacteriocin.» *Appl Environ Microbiol* 72 (2006): 7644–7651.
- Vandamme**, P, B Pot, M Gillis, P de Vos, K Kersters, and J Swings. "Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics." *Microbiol Rev* 60 (1996): 407–438.
- Vaughan**, A, V. G Eijsink, T. F O'Sullivan, K O'Hanlon, and D van Sinderen. «An analysis of bacteriocins, and produced by lactic acid bacteria isolated from malted barley». *J Appl Microbiol*.91 (2001): 131-138.
- Venema**, K, M.H.R Dost, G Venema, and J Kok. "Mutational analysis and chemical modification of Cys24 of lactococcin B,a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis*." *Microbiology* 142 (1996): 2825-2830.
- Verellen** , T.L.J, G Bruggeman , C.A Van Reenen, L.M.T Dicks , et E.J Vandamme . «Fermentation Optimization of Plantaricin 423, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum*423.» *J Ferment Bioeng* 86 (1998): 174-179.
- Vescovo**, M, S Torriani, C Orsi, F Macchiarolo, and G Scolari. "Application of antimicrobialproducing lactic acid bacteria to control pathogens in ready-to-use vegetables." *Journal of Applied Bacteriology* 81 (1996): 113–119.
- Vieira da Silva**, B, J.C.M Barreira, and M.B.P.P Oliveira. "Commensal and probiotic bacteria may prevent NEC by maturing intestinal host defenses." *Trends Food Sci Tech* 50 (2016): 144-158.
- Vignolo** , G, S Fadda, M.N Kairuz, A.A.R Holgado, and G Oliver. "Control of *Listeria monocytogenes* in ground beef by 'Lactocin 705', a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705." *Int J Food Microbiol* 397–402 (1996): 29.
- Vollenweider**, S. "3-hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production." *Appl Microbiol Biotech* 64 (2004): 16-27.
- Vos**, P, et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2e. Vol. 3. New York, NY: Springer-Verlag, 2009.
- Wang**, G, G Feng, A.B Snyder, D.C Manns, J.J Churey, et R.W Worobo. «Bactericidal thurincin H causes unique morphological changes in *Bacillus cereus* F4552 without affecting membrane permeability.» *FEMS Microbiol Lett* 357 (2014): 69 - 76.
- Watson** , D.C, M Yaguchi , J.G Bisailon, R Beudet, and R Morosoli. "The amino acid sequence of a gonococcal growth inhibitor from *Staphylococcus haemolyticus* ." *Biochem J* 252 (1988): 87-93.
- Wattanaphansak**, S, C Gebhart, M Olin, et J Deen. «Measurement of the viability of *Lawsonia intracellularis*.» *CAN J VET RES* 69 (2005): 265–271.
- Wescombe**, P.A, et al. "Production of the lantibiotic salivaricin A and its variants by oral streptococci and use of a specific induction assay to detect their presence in human saliva." *Appl Environ Microb* 72 (2006): 1459-1466.
- Whitehead**, H.R. "A substance inhibiting bacterial growth, produced by certain strains of lactic streptococci." *Biochem J* 27 (1933): 1793–1800.
- Wijaya** , A, C Neudeker, W Holzapfel , et C Franz. *Influence of bacteriocin-producing Enterococcus faecalis BFE 1071 on Lactobacillus spp. in the rat gastrointestinal tract*. Bologna: Proceedings of Food Micro, 2006.
- Wiley**, J.M, and W.A Van Der Donk. "Lantibiotics: Peptides of Diverse Structure and Function." *Annu Rev Microbiol* 61 (2007): 477–501.
- Woraprayote** , W, et al. "Anti-listeria activity of poly(lactic acid)/sawdust particle biocomposite film impregnated with pediocin PA-1/AcH and its use in raw sliced pork." *Int J Food Microbiol* 167 (2013): 229-235.
- Yamamoto**, Y, Y Togawa, M Shimosaka , and M Okazaki. «Purification and characterization of a novelbacteriocinproduced by *Enterococcusfaecalis* strain RJ-11». *Appl. Environ. Microb.* 69 (2003): 5746-5753
- Yamazaki**, K, M Suzuki, Y Kawai, N Inoue, et T.J Montville. «Purification and Characterization of a Novel Class IIa Bacteriocin, Piscicocin CS526, from Surimi-Associated *Carnobacterium piscicola* CS526.» *Appl Environ Microbiol* 71 (2005): 554–557.
- Yanhua**, C, et al. «Class IIa Bacteriocins: Diversity and New Developments.» *Int J Mol Sci* 13 (2012): 16668-16707.
- Yildiz**, F. *Development and manufacture of yogurt and other functional dairy products*. FL: Taylor and Francis group, 2010.
- Zacharof**, M.P, and R.W Lovittb. "Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria." *Review Article APCBEE Procedia* 2 (2012): 50-56.
- Zalan**, Z, A Barath, and A Halasz. "Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains." *Food Technol Biotech* 43 (2005): 219-225.
- Zendo**, T, S Koga, Y Shigeri, J Nakayama, and K Sonomoto. «Lactococcin Q, a novel two-peptide bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* QU 4». *Appl Environ Microbiol*.72 (2006): 3383-3389.
- Zuliani**, V, and P Garry. "Les germes pathogènes dans l'industrie agroalimentaire." *Revue "Salles propres"*, no. 31 (2004): 12-16.
- Zuppa**, A.A , G Alighieri, A Scorrano, et P Catenazzi. «Chapter 8 – Prebiotics and Probiotics in Infant Nutrition.» *Bioactive Foods in Health Promotion* 2 (2016): 11–16.

- Joerger**, M.C et T.R Klaenhammer. "Characterization and purification of helveticin J evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481". *J. Bacteriol.* 167 (1986): 439-446.
- Ettayebi** K, J El Yamani and B Rossi-Hassani . 2000. "Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*". *FEMS Microbiol Lett.* 183 (2000): 191-95
- Ananou** S, E Valdivia, M Martinez Bueno, A Galvez, M Maqueda .. "Effect of combined physico-chemicals preservatives on enterocin AS-48 activity against the enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* CECT 976 strain". *J. Appl. Microbiol.* 97 (2004):48-56
- Ukuku** DO, H Zhang , L Huang ." Growth parameters of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and aerobic mesophilic bacteria of apple cider amended with nisin-EDTA". *Foodborne Pathog Dis.* 6 (2009): 487-94.

Ikram HAMMI

Isolement et caractérisation de bactériocines produites par des souches de bactéries lactiques isolées à partir de produits fermentés marocains et de différentes variétés de fromages français

Résumé

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens produits par des bactéries naturellement immunisées contre leurs propres bactériocines. Ce travail a permis l'identification de nombreuses souches de bactéries lactiques productrices de peptides antimicrobiens. Ces derniers ont été extraits et purifiés par différentes techniques chromatographiques, puis identifiés et caractérisés par la mesure de leurs masses et par l'analyse de leurs structures (approche protéomique et séquençage d'Edman). Parmi les résultats obtenus, il y a :

- la mise en évidence d'une nouvelle bactériocine (maltaricin CPN), appartenant à la classe IIa, isolée et identifiée chez *Carnobacterium maltaromaticum* ;
- l'identification de trois nouvelles espèces productrices de pédiocine PA-1 ;
- l'isolement de souches productrices de bactériocines multiples (appartenant à différentes classes) ;
- la mise en évidence pour certaines bactériocines d'une forte activité antimicrobienne *in vitro* (spectres d'activité incluant des pathogènes).

Les travaux se poursuivent avec l'application de deux souches productrices de bactériocines dans du lait fermenté (Lben) en vue de lutter contre *L. monocytogenes*.

Abstract

Bacteriocins are antimicrobial peptides produced by bacteria naturally immunized against their own bacteriocins. This work has allowed the identification of several strains of lactic bacteria which produce antimicrobial peptides. These have been purified using different chromatographic techniques. Then, they have been identified and characterized by the measurement of their mass and by the analysis of their structure (proteomic approach/ Edman sequencing). Among the obtained results, there was:

- the discovery of a new bacteriocin (maltaricin CPN) produced by *C. maltaromaticum* and belonging to the class IIa ;
- the identification of three new pediocin PA-1 producing species;
- the isolation of bacterial strains which produce multiple bacteriocins belonging to several classes ;
- the *in vitro* determination of a strong antimicrobial activity (affecting pathogens) with some bacteriocins.

This work is still underway with the application of two bacteriocin producing strains in fermented milk (Lben) in order to tackle *L. monocytogenes*.