



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

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

Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules

THESE

Présentée à l'Institut National Polytechnique de Lorraine par

Thibaut JACQUET

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

Interactions peptides antibactériens - surfaces bactériennes
Etude de la carnobactériocine Cbn BM1, une bactériocine de classe IIa

Soutenue publiquement le 23 novembre 2011 devant la commission d'examen

Rapporteurs :

M. Xavier Dousset, Professeur, ONIRIS, Nantes, France

M. Alain Dufour, Professeur, LBCM, Université de Bretagne Sud, France

Examineurs :

Mme Anne-Marie Revol-Junelles, Professeur (Directrice de thèse), ENSAIA, Nancy, France

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

Invité :

M. Raphaël Duval, Maître de conférences HDR, Faculté de Pharmacie, Nancy, France

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

Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules

THESE

Présentée à l'Institut National Polytechnique de Lorraine par

Thibaut JACQUET

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

Interactions peptides antibactériens - surfaces bactériennes
Etude de la carnobactériocine Cbn BM1, une bactériocine de classe IIa

Soutenue publiquement le 23 novembre 2011 devant la commission d'examen

Rapporteurs :

M. Xavier Dousset, Professeur, ONIRIS, Nantes, France

M. Alain Dufour, Professeur, LBCM, Université de Bretagne Sud, France

Examineurs :

Mme Anne-Marie Revol-Junelles, Professeur (Directrice de thèse), ENSAIA, Nancy, France

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

Invité :

M. Raphaël Duval, Maître de conférences HDR, Faculté de Pharmacie, Nancy, France

Remerciements

Ce travail s'est déroulé au Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules de l'ENSAIA-INPL de Nancy. Je remercie le Professeur Joël Scher pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

J'exprime toute ma reconnaissance à Madame Anne-Marie Revol-Junelles, Professeur à l'ENSAIA, pour l'encadrement de mon travail ainsi que pour avoir patiemment corrigé ce document et les différents articles. Je remercie Madame Catherine Cailliez-Grimal, Maître de conférences HDR à l'IUT Nancy-Brabois, pour avoir accepté de co-diriger mon travail de thèse. Merci également à Frédéric Borges, Maître de conférences à l'ENSAIA, pour la pertinence de ses conseils.

Je remercie le Professeur Jean-Bernard Millière, pour la juste rigueur de ses interventions, mais aussi pour nos échanges, toujours enrichissants.

J'adresse mes remerciements à Messieurs Xavier Dousset, Professeur au sein de l'ONIRIS à Nantes, et Alain Dufour, Professeur au LBCM de l'Université de Bretagne Sud, qui ont accepté de juger ce travail en qualité de rapporteurs ainsi qu'à Monsieur Raphaël Duval en tant qu'invité.

Je remercie également Monsieur Grégory Francius, chargé de recherche au LCPME à Nancy, pour m'avoir guidé au cours des nombreux essais de microscopie de force atomique. Merci également à Monsieur Jérôme Duval, chargé de recherche au LEM à Nancy, d'avoir accepté de m'apporter son aide précieuse au sujet des théories de mobilité électrophorétique.

Merci également à Monsieur Mohamed Younsi, Docteur à la Faculté de Médecine de Nancy, de m'avoir permis de réaliser les mesures d'anisotropie de fluorescence.

Je tiens également à remercier l'ensemble du personnel technique qui a la lourde tâche d'assurer le bon fonctionnement d'un laboratoire. Merci aux Carole, à Myriam, à Mlle Turban, Angélique, Nico...

C'est tout naturellement que j'adresse un grand merci à tous mes collègues qui m'ont apporté leur soutien pendant ces trois ans... Nabila pour avoir été représentante des doctorants à mes côtés mais surtout pour avoir été toujours souriante dans l'épreuve... Smaïl, qui, décidément, ne saura jamais faire des réponses simples... Leïla pour son soutien et sa bonne

humeur... Merci aussi à Jordane qui, même s'il ne le sait pas encore, finira un jour par rouler en HD... Un grand merci à Mademoiselle Lhomme et son rire irremplaçable... Un clin d'oeil à l'aquarium et toutes ses sirènes et un grand merci à Charlotte pour son infinie gentillesse. Merci également à Cécile, toujours là pour m'écouter.

Un immense merci à Baptiste pour toute son amitié, son soutien, ses convictions mais aussi pour... ses breuvages maltés! Merci à tous les membres de "*Church of Nimp*", et à Chroune en particulier, pour tous nos grands moments rock'n'rollesques... Merci à Frisouille et à Edgar qui m'ont appris qu'une montre ne sert pas à avoir l'heure...

J'embrasse tout particulièrement Gabrielle, ma moitié, qui a su patiemment me soutenir et m'encourager au quotidien durant ces trois années pas toujours faciles. Un grand merci également à toute la famille Dominique : Jean-Claude, Eliane, Ghislaine et David... Merci également à Gwen et à Adeline!

Je tiens enfin tout particulièrement à remercier mes parents et ma famille pour la confiance et le soutien qu'ils m'ont toujours accordé. Sans eux, il ne m'aurait pas été possible de mener à bien ce projet.

Il est difficile pour l'esprit occidental d'appréhender la notion de 侘寂 selon laquelle rien ne dure, rien n'est fini et rien n'est parfait. Cette notion vient se heurter de front avec notre désir d'atteindre la vérité absolue et, par conséquent, une parfaite maîtrise de toute chose. Mais je crois qu'il nous faut oublier l'idée d'atteindre une vérité une et absolue.

Malgré cela, même dans un état de perpétuel changement et d'avancement vers une fin inéluctable, il nous faut continuer notre recherche de la perfection. Nous devons le faire non pour le résultat en lui-même, mais pour l'acte, qui est de loin le plus important.

Table des matières

Introduction	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique	4
I. <i>Carnobacterium</i> et préservation alimentaire.....	4
I.1. Les bactéries lactiques.....	4
I.1.1. Conservation et amélioration des aliments	5
I.1.2. Rôle probiotique	7
I.2. Le genre <i>Carnobacterium</i>	9
I.2.1. Taxonomie	9
I.2.2. Préservation des aliments.....	11
II. Les bactériocines de classe IIa	14
II.1. Définition	14
II.2. Production	16
II.2.1. Synthèse.....	16
II.2.2. Sécrétion	17
II.2.3. Régulation de la production.....	18
II.3. Structures et fonctions des différentes régions	20
II.3.1. Structuration en milieux apolaire	20
II.3.2. Région N-terminale	20
Charge électrostatique.....	21
Feuillet bêta et motif « YGNGV ».....	21
Ponts di-sulfures	22
Région C-terminale.....	22
Hélice alpha	23
Résidus Tryptophane	23
II.4. Mécanismes d'action	23
II.4.1. Facteurs modulant l'activité	24
Facteurs environnementaux	25
Facteurs biotiques	26
II.4.2. Adsorption : directe ou via un récepteur	26
II.4.3. Différents modèles de mécanismes d'action membranaire.....	28
II.4.4. Conséquences de l'action des bactériocines.....	29
II.5. Immunité.....	31
III. Propriétés physico-chimiques des surfaces bactériennes.....	32
III.1. A l'échelle d'une population bactérienne	33
III.1.1. Composition phospholipidique membranaire	33
III.1.2. Fluidité membranaire	34
III.1.3. Composition de la paroi cellulaire	36
III.1.4. Hydrophobicité de surface et caractère acide/base de Lewis.....	36
Théorie Derjaguin Landau Verwey Overbeek.....	36
Extension de la théorie Derjaguin Landau Verwey Overbeek par van Oss.....	37
III.1.5. Propriétés électro-hydrodynamiques	40
Le potentiel électrocinétique ou potentiel ζ	41
Mesure de la mobilité électrophorétique	42
Théorie des particules molles	43
III.2. A l'échelle de la cellule bactérienne : la microscopie de force atomique	45
Chapitre II : Résultats	50
I. Obtention et caractérisation de la carnobactériocine Cbn BM1.....	50
I.1.1. Production par expression hétérologue chez <i>Escherichia coli</i>	51
I.1.2. Synthèse des peptides par voie chimique.....	52

1.1.3. Dichroïsme circulaire	52
1.2.1. Expression hétérologue chez <i>E. coli</i>	52
1.2.2. Expression hétérologue et purification de Cbn BM1 et Cbn B2	54
1.2.3. Obtention par synthèse chimique et caractérisation de Cbn BM1	57
II. Propriétés de surface de bactéries sensibles et résistantes à Cbn BM1	61
II.1. Introduction	61
II.2. Matériel et méthodes	63
II.2.1. Souches bactériennes et conditions de culture	63
II.2.2. Détermination de l'hydrophobicité de surface et du caractère acide/base de Lewis	63
II.2.3. Détermination de la perméabilité hydrodynamique et de la densité de charge des surfaces	65
II.2.4. Analyse en composante principale	66
II.3. Résultats	66
II.3.1. Perméabilité hydrodynamique et densité de charge des surfaces bactériennes	66
II.3.2. Hydrophobicité et caractère acide/base de Lewis des surfaces bactériennes	70
II.3.3. Analyse en composante principale des propriétés de surface	71
II.4. Discussion	73
III. Mécanismes d'action de Cbn BM1	76
III.1. Introduction	76
III.2. Matériel et méthodes	76
III.2.1. Souches bactériennes et conditions de culture	76
III.2.2. Bactériocine	77
III.2.3. Sondes fluorescentes	77
III.2.4. Détermination de l'intégrité membranaire	77
III.2.5. Mesure de l'anisotropie de fluorescence	78
III.2.6. Mesure des potentiels membranaires	78
III.2.7. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier	78
III.2.8. Mesures de topologie	79
III.3. Résultats	80
III.3.1. Mécanismes d'action de Cbn BM1 sur <i>C. maltaromaticum</i> DSM20730	80
III.3.1.1. Activité antibactérienne de Cbn BM1	80
III.3.1.2. Impact de Cbn BM1 sur l'intégrité membranaire	81
III.3.1.3. Visualisation à haute résolution de bactéries traitées par Cbn BM1	83
III.3.1.4. Impact de Cbn BM1 sur la fluidité membranaire	86
III.3.1.5. Impact de Cbn BM1 sur la force protomotrice membranaire	87
III.3.1.6. Impact de Cbn BM1 sur la sécrétion des protéines	88
III.3.1.7. Discussion	89
III.3.2.1. Activité antibactérienne de Cbn BM1 sur <i>L. monocytogenes</i> EGDe et <i>L. monocytogenes</i> EGDe Δ mpfI	93
III.3.2.2. Interaction entre Cbn BM1 et la membrane plasmique	94
III.3.2.3. Impact de Cbn BM1 sur l'intégrité membranaire	95
III.3.2.4. Visualisation à haute résolution de <i>Listeria monocytogenes</i> EGDe	95
III.3.2.5. Discussion	97
IV. Impact d'un traitement par Cbn BM1 sur les propriétés nano-mécaniques de <i>C. maltaromaticum</i> ..	99
IV.1. Introduction	99
IV.2. Etude	99
IV.2.1. Immobilisation des bactéries sur support	99
IV.2.2. Mesures de force	102
IV.2.2.1. Module d'élasticité (ou module de Young)	102
IV.2.2.2. Constante de raideur	104
IV.2.3. Analyse des résultats des mesures de force	105
Chapitre III : Conclusion générale et perspectives	108
Références bibliographiques	124

Liste des figures

Figure 1. Arbre phylogénétique basé sur la comparaison des séquences de l'ARNr 16S montrant les principaux groupes de bactéries lactiques ainsi que les genres <i>Bifidobacterium</i> et <i>Propionibacterium</i>	4
Figure 2. Classification des bactériocines de classe IIa selon Nissen-Meyer et al. (2009).	15
Figure 3. <i>Loci</i> impliqués dans la production des carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2 et de leur immunité. .	17
Figure 4. Régulation par « <i>quorum sensing</i> » des carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2	19
Figure 5. Modèles de mécanismes d'action des peptides antibactériens	29
Figure 6. Structure chimique des sondes fluorescentes 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH) et 1-(4-triméthylammoniumphényl)-6-phényl-1,3,5-hexatriène (TMA-DPH)	35
Figure 7. Schéma de la mesure des angles de contact.....	38
Figure 8. Représentation schématique du potentiel électrique et de la distribution des charges en fonction de la distance à la surface d'un composé dispersé.....	42
Figure 9. Représentation schématique d'une particule molle.	43
Figure 10. Profils types de mobilité électrophorétique de particules dites « dures » et « molles ».	44
Figure 11. Représentation schématique d'un microscope de force atomique	46
Figure 12. Photographie d'un levier et d'une pointe utilisée en microscopie de force atomique	46
Figure 13. Représentation schématique des protéines de fusion obtenues par expression hétérologue chez <i>Escherichia coli</i>	52
Figure 14. Exemple d'électrophorégramme SDS-PAGE de l'extrait protéique total d' <i>Escherichia coli</i> pET32a BM1-Trx.....	53
Figure 15. Exemple d'électrophorégramme SDS-PAGE de l'extrait protéique totale d' <i>Escherichia coli</i> pET32a BM1-Trx avant et après coagulation thermique.....	54
Figure 16. Exemple de test d'activité antibactérienne de fractions de purification par H.P.L.C. à l'échelle analytique de Cbn BM1 par la méthode de diffusion sur milieu gélosé.	56
Figure 17. Spectre d'absorption U.V. de l'étape de purification par H.P.L.C. de Cbn BM1 à l'échelle semi-préparative.	57
Figure 18. Chromatogramme de l'analyse de pureté de Cbn BM1 obtenu par synthèse chimique.....	58
Figure 19. Spectre d'analyse de masse de Cbn BM1 synthétisé par voie chimique.....	58
Figure 20. Exemple de données utilisées pour la détermination des propriétés physico-chimiques des surfaces bactériennes.	65
Figure 21. Mobilité électrophorétique en fonction de la concentration en KCl de <i>Carnobacterium mobile</i> DSM 4848, <i>Enterococcus durans</i> CIP55125 et <i>Listeria innocua</i> CIP12511	67
Figure 22. Perméabilité hydrodynamique ($1/\lambda_0$ (nm)) de la couche perméable calculée à partir des données électrocinétiques.....	68
Figure 23. Densité volumique des charges électriques (ρ_0 (mM)) de la couche perméable calculée à partir des données électrocinétiques.....	69
Figure 24. Analyse en composante principale des données obtenues expérimentalement.	72
Figure 25. Croissance de <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> DSM20730 en milieu TSB-YE à 30°C en absence ou en présence de 2,5 mg.L ⁻¹ de Cbn BM1	81
Figure 26. Pourcentage de <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> DSM20730 présentant une atteinte de l'intégrité de leur membrane plasmique en absence ou en présence de 2,5 mg.L ⁻¹ de Cbn BM1	82
Figure 27. Pourcentage de <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> DSM20730 en phase stationnaire de croissance présentant une atteinte de l'intégrité de leur membrane plasmique après un traitement par Cbn BM1 (25 mg.L ⁻¹)	82
Figure 28. Imagerie par microscopie de force atomique de <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> DSM 20730 en phase exponentielle de croissance.....	84
Figure 29. Imagerie par microscopie de force atomique de <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> DSM 20730 en phase stationnaire de croissance.....	85

Figure 30. Fluidités membranaires de <i>C. maltaromaticum</i> DSM 20730 au niveau de la surface ou du cœur de la membrane plasmique mesurées par anisotropie de fluorescence..	86
Figure 31. Variations de l'émission de fluorescence du DiSC ₃ (5) et du BCECF après un traitement de <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> DSM20730 par CbnBM1	87
Figure 32. Spectres infrarouge à transformée de Fourier (I.R.T.F.) de surnageants de <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> DSM20730..	88
Figure 33. Croissance de <i>L. monocytogenes</i> EGDe et de <i>L. monocytogenes</i> EGDe Δ mptI en milieu TSB-YE à 37°C en absence ou en présence de 2,5 mg.L ⁻¹ de Cbn BM1.	93
Figure 34. Variations de la fluidité de surface et du cœur de la membrane de <i>L. monocytogenes</i> EGDe et de <i>L. monocytogenes</i> EGDe Δ mptI	94
Figure 35. Pourcentage de la population de <i>Listeria monocytogenes</i> présentant une membrane endommagée suite à un traitement par Cbn BM1 en phase exponentielle de croissance.	95
Figure 36. Visualisation par microscopie de force atomique de <i>Listeria monocytogenes</i> EGDe.	96
Figure 37. Cartographie des modules élastiques (kPa) de <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> DSM20730	103
Figure 38. Distribution des modules d'élasticité (kPa) de <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> DSM20730	103
Figure 39. Cartographie des constantes de raideur (N/m) de <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> DSM20730	104
Figure 40. Distribution des constantes de raideur (N/m) de <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> DSM20730	104
Figure 41. Evolution des valeurs d'élasticité de <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> DSM20730 en fonction du temps en présence de Cbn BM1.	105
Figure 42. Evolution des valeurs de raideur de <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> DSM20730 en fonction du temps en présence de Cbn BM1.	106

Liste des tableaux

Tableau 1. Exemples d'aliments faisant appel à la fermentation par des bactéries lactiques.	6
Tableau 2. Résumé de différents effets sur la santé de la consommation de probiotiques associés aux produits laitiers fermentés.	8
Tableau 3. Espèces appartenant au genre <i>Carnobacterium</i> et leurs origines.	10
Tableau 4. Produits alimentaires au sein desquels a été isolé <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> .	11
Tableau 5. Bactériocines produites par <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> .	13
Tableau 6. Spectre d'activité et concentrations minimales inhibitrices des carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2 purifiées obtenues par expression hétérologue chez <i>Escherichia coli</i> .	16
Tableau 7. Séquences protéiques et masses moléculaires des carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2.	51
Tableau 8. Gradient de solvant utilisé pour la purification de Cbn BM1 et Cbn B2.	55
Tableau 9. Hélicité de Cbn BM1 en solutions mimant les membranes plasmiques déterminée par dichroïsme circulaire.	59
Tableau 10. Souches bactériennes et concentration minimale inhibitrice (C.M.I.) de Cbn BM1.	64
Tableau 11. Perméabilité hydrodynamique moyenne (1/ λ 0) et densité de charge moyenne (ρ 0) pour les souches résistantes et sensibles à Cbn BM1.	69
Tableau 12. Affinités des souches pour les solvants	70
Tableau 13. Méthodes utilisées pour immobiliser les bactéries pour la microscopie de force atomique en milieu liquide.	101

Introduction

Introduction

Au sein de chaque niche écologique existe une compétition entre les différentes souches bactériennes. Au cours de l'évolution, cette compétition a conduit à une véritable course aux armements ayant pour conséquence l'existence d'une très grande diversité de composés antimicrobiens. Parmi ceux-ci peuvent être cités les produits du métabolisme tels que l'acide lactique, le peroxyde d'hydrogène ou le gaz carbonique, ou encore des peptides tels que les bactériocines. Ces dernières présentent une grande diversité de composition, de structures, de spectre, de mode et de mécanismes d'action.

L'évolution des habitudes alimentaires avec, d'une part, le développement de produits crus ou prêts à consommer et, d'autre part, la demande des consommateurs en produits perçus comme plus naturels, ont conduit les acteurs des industries agro-alimentaires à envisager l'utilisation des bactériocines comme une alternative saine aux conservateurs de nature "chimique". Une telle approche de préservation alimentaire peut présenter de nombreux bénéfices par rapport aux pratiques actuelles. Elle s'accompagne d'un développement complexe compte tenu des spécificités des bactériocines en tant que telles ou des aspects purement réglementaires liés à l'utilisation de souches bactériennes productrices de tels composés.

Afin de développer les possibles applications des bactériocines en conservation alimentaire, il apparaît indispensable d'approfondir les connaissances relatives à ce type de molécule. La connaissance approfondie de leurs mécanismes d'action permettra une meilleure maîtrise de leur utilisation.

Les travaux présentés au sein de cette thèse s'inscrivent dans la continuité des études menées au laboratoire concernant la caractérisation des interactions entre bactériocines et membranes bactériennes et l'étude des paramètres clés régissant la spécificité d'action des bactériocines de classe IIa.

La spécificité d'action d'une bactériocine peut avoir plusieurs origines, telles que la nature de la bactériocine elle-même *via* sa séquence et sa structure tridimensionnelle, le

mécanisme d'action plus ou moins spécifique, ou la nature de la souche cible et notamment les propriétés de son enveloppe cellulaire et de sa membrane, site d'action des bactériocines. Les travaux s'articulent principalement autour de ces deux aspects distincts.

La relation entre les propriétés physico-chimiques des surfaces de différentes souches bactériennes et leur phénotype de sensibilité/résistance ont été étudiés à l'aide d'outils techniques et théoriques issus des domaines de la biophysique.

Le second axe d'étude retenu concerne l'élucidation des mécanismes d'action et notamment l'étude du degré d'interaction des bactériocines avec les membranes et la visualisation de leurs effets sur des cellules bactériennes.

Le choix de la bactériocine modèle s'est porté sur la carnobactériocine BM1 (Cbn BM1) produite par *Carnobacterium maltaromaticum*, espèce dont les propriétés technologiques et bio-protectrices sont étudiées au laboratoire.

Les mécanismes d'action cellulaires ont été étudiés sur trois souches cibles : *Carnobacterium maltaromaticum* DSM20730, une souche sensible phylogénétiquement proche de la souche productrice de Cbn BM1, *Listeria monocytogenes* EGDe, une souche sensible, et *Listeria monocytogenes* EGDe Δ *mptI*, un mutant n'exprimant pas la mannose perméase de type II, résistant à l'action de Cbn BM1.

Les résultats obtenus lors de cette thèse sont organisés en trois chapitres.

Le premier chapitre est consacré à la revue bibliographique et s'articule en trois parties. La première est consacrée au genre *Carnobacterium* et son implication en préservation alimentaire, la deuxième aux bactériocines de classe IIa et la dernière partie est relative aux propriétés physico-chimiques des surfaces bactériennes.

Le deuxième chapitre dédié aux résultats débute par la stratégie d'obtention de bactériocine purifiée, puis la caractérisation physico-chimique des surfaces de souches bactériennes sensibles ou résistantes à Cbn BM1 est présentée. L'étude des mécanismes d'action de Cbn BM1 sur *C. maltaromaticum* DSM20730 et sur *L. monocytogenes* EGDe et EGDe Δ *mptI* est présentée en troisième partie. Enfin, des travaux relatifs à l'impact de Cbn BM1 sur les propriétés nano-mécaniques de *C. maltaromaticum* DSM20730 viendront clore le chapitre dédié aux résultats.

Le troisième chapitre est consacré aux conclusions générales et aux perspectives que laissent entrevoir ce travail.

Publications

Afzal M.I., Jacquet T., Delaunay S., Borges F., Millière J.B., Revol-Junelles A.M., Cailliez-Grimal C. (2010) "*Carnobacterium maltaromaticum*: identification, isolation tools, ecology and technological aspects in dairy products." Food Microbiology. Aug;27(5):573-9.

Jacquet T., Cailliez-Grimal C., Borges F., Gaiani C., Francius G., Duval J., Waldvogel Y., Revol-Junelles A.M. (2011) "*Surface properties of bacteria sensitive and resistant to the class Iia carnobacteriocin Cbn BM1.*" Journal of Applied Microbiology. (acceptée)

Jacquet T., Francius G., Cailliez-Grimal C., Revol-Junelles A.M. (2011) "*Visualization of the class Iia bacteriocin Cbn BM1 action on Listeria monocytogenes EGDe by fluorescence assays and atomic force microscopy.*" Journal of Dairy Science (soumise)

Jacquet T., Cailliez-Grimal C., Borges F., Imran M., Francius G., Duval J., Revol-Junelles A.M. (2011) "*Antibacterial activity of carnobacteriocin BM1 relies on the physiological state of the target bacteria.*" Research in Microbiology (soumise)

Communications orales

Jacquet T., Cailliez-Grimal C., Borges F., Francius G., Revol-Junelles A.M. "*Class Iia bacteriocins : natural weapons against foodborne pathogens.*" Séminaire de l'école doctorale RP2E, Janvier 2011, Nancy, France.

Jacquet T., Cailliez-Grimal C., Borges F., Waldvogel Y., Milliere J.B., Revol-Junelles A.M. (2010) "*Surface properties of some target cells, sensitive or resistant, to carnobacteriocin Cbn BM1.*" 17^{ème} Symposium du Club des Bactéries Lactiques, Nancy, France, 27-29 octobre.

Communications affichées

Jacquet T., Cailliez-Grimal C., Borges F., Gaiani C., Francius G., Duval J., Waldvogel Y., Revol-Junelles A.M. (2010) "*Can class Iia bacteriocin sensitivity be predicted by bacterial surface properties characterization?*" International Conference on Antimicrobial Research, Valladolid, Spain, 3-5 novembre.

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. *Carnobacterium* et préservation alimentaire

I.1. Les bactéries lactiques

Sous l'appellation « bactéries lactiques » se trouve un ensemble de bactéries à Gram positif présentant une très grande variété de caractéristiques physiologiques, métaboliques et morphologiques. Cette appellation regroupe des bactéries en forme de bâtonnet ou de coque ne formant pas de spores, ne synthétisant pas de catalase et dépourvues de cytochromes. Les bactéries lactiques sont tolérantes à un pH acide, aéro-anérobies et produisent de l'acide lactique comme produit majoritaire de la fermentation des glucides (Kandler, 1983). Certaines bactéries lactiques vivent en symbiose ou en commensalisme avec des hôtes animaux bien que certaines souches puissent être des pathogènes opportunistes (Nakano *et al.*, 2010).

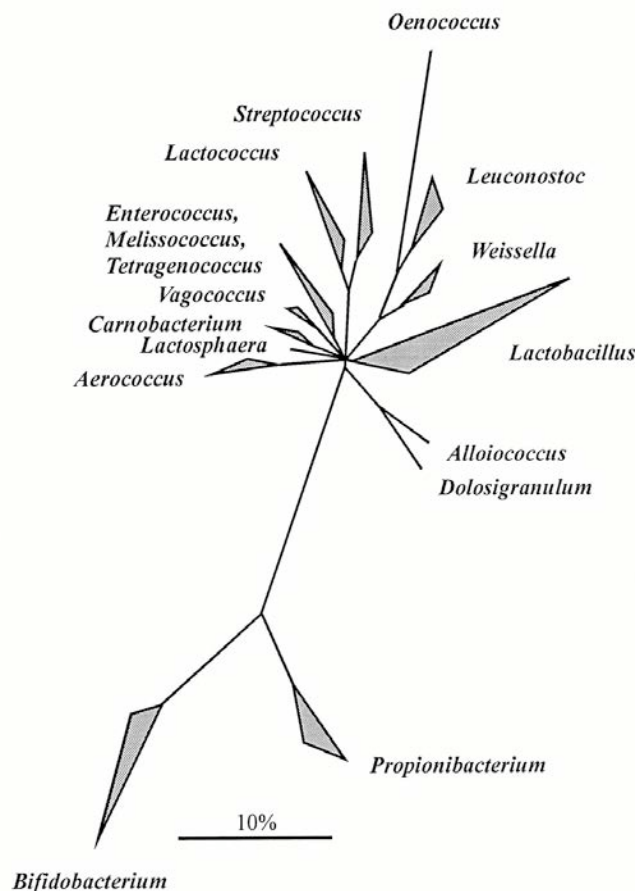


Figure 1. Arbre phylogénétique basé sur la comparaison des séquences de l'ARNr 16S montrant les principaux groupes de bactéries lactiques ainsi que les genres *Bifidobacterium* et *Propionibacterium*. D'après Holzapfel *et al.*, 2001.

Elles font partie de la flore bactérienne normale chez l'homme où elles sont présentes au sein de la cavité orale, du tractus intestinal et du vagin. Le terme de bactérie lactique est habituellement réservé aux genres *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella* (Adams, 1999). Les différents genres constituant le groupe des bactéries lactiques présentent une proximité génétique entre ces différents genres (Figure 1). Ces dernières occupent des niches écologiques où se trouvent en quantité des acides aminés, des vitamines et des bases azotées. Ce type d'environnement a donc conduit au cours de l'évolution à la perte des gènes codant pour de nombreuses voies de biosynthèse de ces composés.

I.1.1. Conservation et amélioration des aliments

De nombreux aliments sont issus de la fermentation de produits d'origine animale ou végétale par des bactéries lactiques (Tableau 1). Le rôle premier de ce processus de fermentation est d'augmenter la durée de conservation des aliments. En effet, les bactéries lactiques synthétisent un ensemble de composés qui, s'ils sont produits au sein d'un aliment, vont permettre de limiter le développement d'autres souches bactériennes potentiellement impliquées dans la dégradation de ce dernier. Parmi ces composés, les acides organiques jouent un rôle important (Davidson, 1997) et notamment l'acide lactique qui perturbe le maintien du potentiel membranaire et inhibe les transports actifs (de Vuyst et Vandamme, 1994 ; Sheu *et al.*, 1972). Le dioxyde de carbone résultant de la fermentation hétérolactique joue également un rôle antibactérien en créant un environnement anaérobie qui s'avère toxique pour certaines souches en raison d'une perturbation de la régulation du pH intracellulaire (De Vuyst et Vandamme, 1994) bien qu'il puisse, à faible concentration, favoriser la croissance d'autres souches (Lindgren et Dobrogosz, 1990). Une autre catégorie de molécules produites par les bactéries lactiques jouent un rôle majeur dans l'inhibition de souches bactériennes : il s'agit des bactériocines (Cotter *et al.*, 2005). Celles-ci seront décrites plus en détail au sein du chapitre suivant. La fermentation des aliments par des bactéries lactiques permet donc d'augmenter très nettement leur durée de vie (Steinkraus, 1996) tout en inhibant des souches bactériennes potentiellement pathogènes telles que *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni* ou *Salmonella Typhimurium* (Gálvez *et al.*, 2007 ; Svanberg *et al.*, 1992).

Tableau 1. Exemples d'aliments faisant appel à la fermentation par des bactéries lactiques.

Aliment	Ingrédient	Région
<i>Produits laitiers</i>		
Trahanas	Lait	Grèce
Dadih	Lait	Indonésie
Yaourt	Lait	Monde
Fromages	Lait	Monde
<i>Viande</i>		
Salami	Viande	Monde
<i>Poisson</i>		
Funazuchi	Poisson	Japon
<i>Légumes</i>		
Choucroute	Chou	Europe et Amérique du Nord
Dawadawa	Caroube	Afrique de l'Ouest
Gari	Cassava	Nigéria
Poi	Taro	Hawaï
Miso	Soja	Asie du Sud-Est
<i>Céréales</i>		
Koko	Sorgho	Ghana
Bière lambic	Orge	Belgique
Kaanga piro	Maïs	Nouvelle Zélande

La fermentation conduit également à une amélioration des qualités nutritionnelles des aliments (Steinkraus, 1996). Le taux en protéine, la teneur en lysine (Cronk *et al.*, 1977), en méthionine (Aykroyd, 1961 ; Rajalakshmi et Vanaja, 1967) et en vitamines (notamment la thiamine, la riboflavine, la niacine et l'acide folique) (Jelliffe, 1968) s'en trouvent améliorés. Une telle amélioration des apports nutritionnels est très importante notamment pour des populations dont l'accès à une nourriture quantitativement ou qualitativement suffisante est difficile.

La présence de bactéries lactiques au sein d'aliments conduit également au développement de tout un ensemble de propriétés organoleptiques résultant directement, ou non, de leur activité métabolique. Le choix des souches utilisées va ainsi influencer la texture de yaourts (Sodini *et al.*, 2004), la saveur de fromages (Smit *et al.*, 2005a) et de charcuterie (Fadda *et al.*, 2010), les propriétés organoleptiques globales de la choucroute (Beganović *et al.*, 2011), du vin (Yoo *et al.*, 2010) et de produits non traditionnels tels que des « smoothies » (Di Cagno *et al.*, 2011). Ainsi, l'espèce *Carnobacterium maltaromaticum*, isolée dans différents aliments (voir partie dédiée), développe des arômes par production de différents aldéhydes (Miller *et al.*, 1974). Il est toutefois à noter que les bactéries lactiques sont considérées comme ayant un impact négatif sur la bière (Haakensen *et al.*, 2009 ; Sakamoto et

Konings, 2003) bien qu'un rôle protecteur vis-à-vis de contaminations fongiques ait été proposé (Rouse et van Sinderen, 2008).

I.1.2. Rôle probiotique

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte. Les premiers travaux concernant la consommation de produits contenant des probiotiques ont été initiés à la fin du XIXème siècle et au début du XXème. C'est à cette époque que le lien entre la consommation de produits fermentés et son impact bénéfique sur la santé a été fait grâce à l'étude de *Lactobacillus acidophilus* par Tissier et Moro (Rasić et Kurmann, 1983) et de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* par Metchnikoff (1910). Ce dernier, en faisant le lien entre la consommation de cette souche bactérienne et la longévité des consommateurs, a initié l'ensemble des travaux portant sur les probiotiques. La grande quantité de travaux qui ont suivi a alors conduit à une forte augmentation de la consommation de laits fermentés dans de nombreux pays. Ce type de produit connaît encore aujourd'hui un intérêt croissant au sein de la population grâce à ses qualités nutritionnelles et sa perception auprès du consommateur comme produit « naturel » et bénéfique pour sa santé. Cet aspect a été conforté par diverses études montrant un impact positif de la consommation de probiotiques (Tableau 2). Ainsi, les probiotiques sont ajoutés à de nombreux produits courants tels que le lait infantile (Braegger et al., 2011), les suppléments alimentaires à visée sportive (Nichols, 2007) ou encore la crème glacée (Di Criscio et al., 2010), leur conférant, au moins théoriquement, de nouvelles propriétés bénéfiques à la santé du consommateur.

Les bactéries présentes au sein du tractus gastro-intestinal présentent un grand nombre de fonctions telles que la synthèse de vitamines (des groupes B et K notamment), d'enzymes digestives comme la lactase, la compétition avec des souches pathogènes pour la colonisation ou encore le développement et la stimulation du système immunitaire. L'équilibre de cette flore peut être perturbé par de nombreux facteurs tels que la consommation d'antibiotiques, le stress ou l'état de santé général d'une personne. L'expression de certains gènes des cellules intestinales est affectée par la flore commensale (Hooper *et al.*, 2001). Il paraît donc probable que différentes souches bactériennes puissent induire des modulations différentes.

Tableau 2. Résumé de différents effets sur la santé de la consommation de probiotiques associés aux produits laitiers fermentés (adapté de Tamime, 2002 et Tamime *et al.*, 1999).

Cible	Effet / Bénéfice
Tractus digestif	Actif contre <i>Helicobacter pylori</i> Amélioration de la digestion du lactose Stimulation de l'immunité intestinale Stabilisation de la maladie de Crohn Stimulation du péristaltisme
Flore intestinale	Améliore l'équilibre entre les populations bactériennes Colonisation de l'intestin Protection contre <i>Salmonella sp.</i>
Diarrhée	Prévention et traitement des diarrhées aiguës et à <i>Rotavirus</i> Prévention des diarrhées dues à des antibiotiques Traitements des diarrhées dues à <i>Clostridium difficile</i>
Autres	Amélioration de l'immunité Réduction du cholestérol sérique Réduction de l'hypertension Inhibition de la croissance de tumeur cancéreuse

Partant de ce constat, les manipulations de la flore bactérienne, en utilisant des probiotiques, ouvrent de nouvelles possibilités en terme de prévention de certaines pathologies. Ainsi, leur utilisation a permis de soigner des cas de syndrome métabolique (Crichton *et al.*, 2011), de diverses maladies gastro-intestinales (Benchimol et Mack, 2004 ; Marteau *et al.*, 2001), d'intolérance au lactose (Marteau *et al.*, 1990) et d'eczéma chez les enfants à risque (Isolauri *et al.*, 2000). Bien que la quantité de probiotique à consommer pour produire un effet sur la santé ne soit pas déterminée, il a été suggéré qu'un apport journalier d'au moins 10^8 - 10^9 bactéries viables serait un minimum (Roy, 2005), ce qui est compatible avec les contraintes de production de l'industrie alimentaire (Lacroix et Yildirim, 2007 ; Sanders *et al.*, 1996).

La consommation de probiotiques permettrait de réduire les phénomènes d'immunosénescences. Ainsi, la consommation de *Lactobacillus plantarum* CECT7315/7316 conduit à une amélioration de l'immunité et la diminution de la survenue d'infections chez

des personnes âgées (Mañé *et al.*, 2011). De même, la consommation de certaines souches de *Lactobacillus gasseri*, de *Lactobacillus fermentum* et de *Lb. plantarum* isolées de fèces humaines et de Kimchi induisent une prolifération des lymphocytes et l'augmentation de leur sécrétion d'interféron γ (Lee *et al.*, 2011b). D'autres travaux ont également montré que certaines souches de bactéries lactiques étaient capables de réduire l'infection de cellules HT29 par des souches hémorragiques d'*Escherichia coli* (Stöber *et al.*, 2010).

De nombreuses études montrent également un impact positif de la consommation de probiotiques sur le taux de cholestérol sérique dans des modèles animaux. Ainsi la consommation de *Lactobacillus fermentum* SM-7 par des souris hyperlipidémiques conduit à une diminution significative du cholestérol sérique total, des triglycérides totaux, des lipoprotéines de basse densité, de l'indice athérogène et de la masse corporelle (Pan *et al.*, 2011). Une étude analogue chez des rats montre également une diminution du cholestérol sérique total suite à la consommation de *Lactobacillus acidophilus* A4 (Lee *et al.*, 2010) ou d'un mélange de bactéries lactiques (Lee *et al.*, 2011a).

La consommation de yaourt peut également inhiber la croissance de tumeurs du colon chez un modèle murin (de Moreno de Leblanc et Perdígón, 2010). Cette activité est due à une diminution de la réponse inflammatoire et de l'expression d'enzymes pro-carcinogènes (de Moreno de Leblanc et Perdígón, 2010). De même, la consommation de *Lactobacillus helveticus* R389 retarde la croissance de tumeurs du sein en diminuant la concentration en interleukine 6 et en augmentant celle en interleukine 10, ainsi que le nombre de cellules immunitaires au sein de la tumeur (de Moreno de Leblanc et Perdígón, 2010).

I.2. Le genre *Carnobacterium*

I.2.1. Taxonomie

Le genre *Carnobacterium* a été créé suite à la reclassification de certains lactobacilles atypiques hétérofermentaires isolés à partir d'échantillons de viande conditionnée sous vide, de poulet et de poisson (Borch et Molin, 1988). Ces souches s'avèrent incapable de croître sur un milieu contenant de l'acétate (Collins *et al.*, 1987 ; Hammes et Hertel, 2006), produisent de l'acide lactique à partir du glucose et se caractérisent par la présence d'acide méso-diaminopimélique au sein de leur paroi.

Le séquençage de l'ADN ribosomique 16S a montré que les bactéries appartenant à ce genre forment un groupe phylogénétiquement cohérent relativement distinct des autres bactéries lactiques (Wallbanks *et al.*, 1990).

Tableau 3. Espèces appartenant au genre *Carnobacterium* et leurs origines (adapté d'après Leisner *et al.*, 2007).

Espèces	Isolée à partir de	
	Aliments	Environnement
<i>C. alterfunditum</i>	-	Poissons, mers et lacs polaires, sédiments marins
<i>C. divergens</i>	Produit laitier, viande, poisson, crevette	intestin de poisson
<i>C. funditum</i>	-	Mers et lacs polaires, éponge marine, poisson
<i>C. gallinarum</i>	Viande	Poisson
<i>C. inhibens</i>	-	Poisson
<i>C. jeotgali</i>	Crevette	-
<i>C. maltaromaticum</i>	Produit laitier, viande, poisson, crevette	Poisson, intestin de chenille, mer polaire, tuf
<i>C. mobile</i>	Viande, crevette	Poisson
<i>C. pleistocenium</i>	-	Permafrost
<i>C. viridans</i>	Viande	-

A l'origine, le genre *Carnobacterium* contenait quatre souches (Collins *et al.*, 1987) : *Carnobacterium divergens* comb. nov., *C. gallinarum* sp. nov., *C. mobile* sp. nov. et *Carnobacterium piscicola*, qui est identique à *Lactobacillus maltaromaticus* (Miller *et al.*, 1974) isolées du lait. Pour ces deux dernières souches, le nom de *Carnobacterium maltaromaticum* a alors été retenu et l'espèce type en est *C. maltaromaticum* DSM 20342^T (identique à ATCC 27865^T, CCUG 30142^T, CIP 103135^T, JCM 1154^T, LMG 6903^T, NRRL-B 14852^T) (Mora *et al.*, 2003). Deux groupes ont été définis en fonction de l'environnement dans lequel les souches ont été isolées. Le groupe I est composé de souches isolées à partir d'animaux ou de produits d'origine animale et le groupe II, quant à lui, comporte des souches isolées des milieux froids (Hammes et Hertel, 2009). La taxonomie de ce genre a été étudiée par analyse numérique (Lai et Manchester, 2000). Sur une base de quatre-vingt douze caractéristiques, trois groupes ont été identifiés dont le groupe A correspondant à *C. maltaromaticum*. Actuellement, le genre *Carnobacterium* comporte dix espèces (Tableau 3) (Leisner *et al.*, 2007 ; Kim *et al.*, 2009). L'espèce *C. maltaromaticum* a été isolée de différents aliments tels que les produits laitiers, les poissons et crustacés et la viande (Tableau 4). Cette espèce a été initialement isolée à partir de lait ayant développé des saveurs maltées et

chocolatées et des arômes correspondant à la présence d'aldéhydes (3-méthylbutanal, le 2-méthylbutanal et le 3-méthylpropanal) (Miller *et al.*, 1974).

Tableau 4. Produits alimentaires au sein desquels a été isolé *Carnobacterium maltaromaticum* (Afzal *et al.*, 2010).

Produits	Références
<i>Produits laitiers</i>	
Lait écrémé	Miller <i>et al.</i> , 1974
Fromages à pâte molle	Cailliez-Grimal <i>et al.</i> , 2005
Mozzarella	Morea <i>et al.</i> , 1999
<i>Poisson et crustacés</i>	
Saumon ^a	Emborg <i>et al.</i> , 2002
Saumon fumé	Leroi <i>et al.</i> , 1998
	Duffes <i>et al.</i> , 1999a
Crevettes décortiquées	Jaffrès <i>et al.</i> , 2009
	Mejlholm <i>et al.</i> , 2005
Crevettes en saumure	Mejlholm <i>et al.</i> , 2008
<i>Viande</i>	
Bœuf (muscle) ^a	Ercolini <i>et al.</i> , 2009
Porc mariné	Schirmer <i>et al.</i> , 2009
Poulet ^a	Vihavainen <i>et al.</i> , 2007

^a produit sous atmosphère modifiée

I.2.2. Conservation des aliments

L'espèce *Carnobacterium maltaromaticum* présente un grand intérêt en terme de production de bactériocines (Leisner *et al.*, 2007). En effet, six bactériocines ont été décrites comme étant produites par cette espèce et permettent d'inhiber la croissance de souches impliquées dans la détérioration de produits alimentaires (Tableau 5). Parmi celles-ci, celles appartenant au genre *Listeria* présentent certaines caractéristiques proches du genre *Carnobacterium* : elles sont psychrotrophes et présentent le même comportement vis-à-vis des variations de pH et de température (Buchanan et Klawitter, 1991a,b ; Cailliez-Grimal *et al.*, 2007 ; Herbin *et al.*, 1997). La production de bactériocines au sein du genre *Carnobacterium* a donc été décrite pour des souches isolées de viande ou de poisson. Les travaux de Millière *et al.* (1994) ont montré pour la première fois la présence de *Carnobacterium* spp. au sein de produits laitiers. Parmi les souches isolées au sein de ces produits, *C. maltaromaticum* CP5 (anciennement *C. piscicola* CP5) produit deux bactériocines de classe IIa, les carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2 (Herbin *et al.*, 1997). Différentes stratégies de

préservation des aliments réfrigérés tels que le saumon fumé et des aliments transformés, vis-à-vis d'une contamination par *L. monocytogenes* ont été testées (Herbin *et al.*, 1997 ; Buchanan et Klawitter, 1991a,b). Ces études font appel soit à l'addition directe de bactériocines produites par des souches appartenant au genre *Carnobacterium*, soit à l'incorporation de souches productrices de bactériocines dans l'aliment. Ainsi, l'addition de piscicoline 126, produite par *C. piscicola* JG126, dans du lait et du fromage de type camembert (Wan *et al.*, 1997) a révélé la capacité de cette bactériocine à inhiber la croissance de *L. monocytogenes* sans affecter la viabilité des souches « starter » et leur activité d'acidification. Le contrôle de la production de la piscicoline 126 par *C. maltaromaticum* est un exemple de système de production de bactériocine régulé par la température. Ainsi, au dessus de 25°C, la piscicoline 126 n'est pas produite à un niveau détectable en milieu liquide (Gursky *et al.*, 2006).

L'influence de différentes conduites de fermentation sur la production de composés de type bactériocines a été étudiée par utilisation de différents milieux de cultures pour *C. maltaromaticum* Cp L103. Bien que ces composés présentent un effet bactériostatique sur des souches de *L. monocytogenes* issues de saumon conditionné sous vide, l'utilisation d'une seule bactériocine n'est pas suffisante pour avoir un niveau de sécurité alimentaire suffisant vis-à-vis de ce contaminant. D'autres stratégies telles que l'utilisation conjointe de deux bactériocines ou de facteurs augmentant leur activité doivent être employées (Schöbitz *et al.*, 2006). Une température de stockage plus basse et la présence de souches de *C. maltaromaticum* ont augmenté l'inhibition de *L. monocytogenes* (Azuma *et al.*, 2007 ; Brillet *et al.*, 2004 ; Campos *et al.*, 1997 ; Duffes *et al.*, 1999a,b ; Yamazaki *et al.*, 2005). Néanmoins, l'inactivation des bactériocines par des enzymes protéolytiques et l'émergence de souches résistantes ont conduit à l'utilisation de souches de *C. maltaromaticum* ne produisant pas de bactériocines. Cette approche serait plus adaptée pour l'utilisation de la souche en tant qu'agent conservateur qui réduirait alors la croissance de *L. monocytogenes* par déplétion du glucose (Nilsson *et al.*, 1999 ; Nilsson *et al.*, 2005).

Tableau 5. Bactériocines produites par *Carnobacterium maltaromaticum* (Afzal *et al.*, 2010).

Bacteriocines (classe)	Souche	Activité contre **	Masse moléculaire (A.A.)***	Localisation du gène (gène)	Référence	
Carnobactériocine BM1 (IIa)	LV17B		4524 (43)	Chromosome (<i>cbnBM1</i>)	Quadri <i>et al.</i> 1994	
*Cbn B1	LV17B	<i>C. divergens</i>	4541 (43)			
*Piscicocine V1b	V1	<i>E. faecalis</i>	4526 (44)			
*Carnocine CP51	CP5	<i>Lb. curvatus</i>				
		<i>Lb. plantarum</i>				
		<i>Ln. mesenteroides</i>				
		<i>L. innocua</i>				
		<i>L. monocytogenes</i>				
		<i>P. acidilactici</i>				
Carnobactériocine B2 (IIa)	LV17B	<i>C. divergens</i>	4969 (48)	Plasmide (<i>cbnB2</i>)	Quadri <i>et al.</i> 1994	
*A9b	A9b	<i>L. monocytogenes</i>				Nilsson <i>et al.</i> , 2002
*Carnocine CP52	CP5					Herbin <i>et al.</i> 1997
Piscicoline 126 (IIa)	JG126		4416 (44)	Chromosome (<i>pisA</i>)	Jack <i>et al.</i> , 1996	
*Piscicocine V1a	V1	<i>C. divergens</i>				Bhugaloo-Vial <i>et al.</i> 1996
*Piscicoline126	UAL26	<i>Carnobacteriumsp</i>				Gursky <i>et al.</i> 2006
		<i>E. faecalis</i>				
		<i>E. faecium</i>				
		<i>Lb. curvatus</i>				
		<i>Ln. dextranicum</i>				
		<i>Ln. mesenteroides</i>				
		<i>L. grayi</i>				
		<i>L. innocua</i>				
		<i>L. ivanovii</i>				
		<i>L. monocytognes</i>				
		<i>L. seeligeri</i>				
		<i>P. acidilactici</i>				
		<i>P. pentosaceus</i>				
		<i>S. thermophilus</i>				
Carnobactériocine A (IIc)	LV17A	<i>C. divergens</i>	5052 (53)	Plasmide (<i>cbnA</i>)	Worobo <i>et al.</i> , 1994	
*Piscicoline 61	LV61	<i>C. gallinarum</i>				Holck <i>et al.</i> , 1994
		<i>C. maltaromaticum</i>				
		<i>E. faecalis</i>				
Piscicocine CS526 (IIa)	CS526	<i>E. durans</i>	4430	n.d.	Yamazaki <i>et al.</i> , 2005	
		<i>E. faecalis</i>				
		<i>E. faecium</i>				
		<i>E. hirae</i>				
		<i>Ln. mesenteroides</i>				
		<i>L. grayi</i>				
		<i>L. innocua</i>				
		<i>L. monocytogenes</i>				
		<i>P. pentosaceus</i>				
Carnocycline A	UAL30	<i>C. maltaromaticum</i>	5880 (60)	n.d.	Martin-Visscher <i>et al.</i> , 2008	
		<i>C. divergens</i>		(cclA)		
		<i>E. faecalis</i>				
		<i>E. faecium</i>				
		<i>Lc. lactis</i>				
		<i>Ln. mesenteroides</i>				
		<i>L. monocytogenes</i>				
		<i>P. acidilactici</i>				
		<i>S. aureus</i>				

*.Synonyme **. B: *Brochothrix*; C: *Carnobacterium*; E: *Enterococcus*; L: *Listeria*; Lb: *Lactobacillus*; Lc: *Lactococcus*; Ln: *Leuconostoc*; P: *Pediococcus*; S: *Staphylococcus*; n.d. : non déterminé ***. Nombre d'acides aminés.

Afin de développer de nouvelles applications, ou d'optimiser celles déjà existantes, il est donc nécessaire d'approfondir les connaissances relatives à la structure et à la fonction des bactériocines, et notamment des bactériocines de classe IIa.

II. Les bactériocines de classe IIa

Les bactéries lactiques synthétisent de nombreux métabolites qui participent à l'amélioration de la conservation des produits alimentaires. Parmi ces métabolites présentant une activité antibactérienne figurent les bactériocines.

II.1. Définition

Les bactériocines sont des peptides capables d'inhiber notamment la croissance de bactéries pathogènes à Gram positif d'intérêt alimentaire appartenant à différents genres tels que *Bacillus*, *Clostridium*, *Listeria* et *Staphylococcus* (Jack *et al.*, 1995). Les bactériocines constituent un groupe hétérogène en termes de poids moléculaires, de propriétés biochimiques, de spectres et de mécanismes d'action. Une distinction peut être faite au sein de l'ensemble des bactériocines produites par les bactéries lactiques avec d'une part les peptides contenant une lanthionine (classe I) et les peptides ne présentant pas de modifications post-traductionnelles (classe II). La classe II peut à son tour être séparée en différents sous-groupes constitués par les bactériocines présentant une activité anti-*Listeria* (classe IIa), les bactériocines à deux composantes (classe IIb) et les bactériocines circulaires (classe IIc) (Diep et Nes, 2002 ; Nes *et al.*, 1996). Il existe également une classe III regroupant les bactériocines thermosensibles de haut poids moléculaire telles que l'hélvéticine J (Joerger et Klaenhammer, 1990) et la milléricine B (Beukes et Hastings, 2001).

Parmi les bactériocines produites par les bactéries du genre *Carnobacterium*, une seule appartient à la classe I, la bactériocine UI149 (Stoffels *et al.*, 1992a,b), et une dizaine appartient à la classe II dont la majorité est de la sous-classe IIa. Concernant l'espèce *Carnobacterium maltaromaticum*, celle-ci produit quatre bactériocines de sous-classe IIa parmi les six produites au total: la carnobactériocine Cbn BM1, la carnobactériocine Cbn B2, la piscicoline 126 et la piscicocine CS526 (Tableau 5).

Les bactériocines de classe IIa ou "pediocin-like" présentent un faible poids moléculaire (< 10 kDa), sont thermostables et ne présentent pas de modifications post-traductionnelles. Elles sont composées de 37 acides aminés, pour la leucocine A et la mésentéroïne Y105, à 48 acides aminés pour la carnobactériocine B2 et l'entéroïne SE-K4. Ces peptides ont une charge nette positive avec des valeurs de pI comprises entre 8 et 10. Les peptides de sous-classe IIa présentent également une séquence conservée en N-terminal : le motif **YYGNGV-C---C-V---A** (Drider et al., 2006). Du point de vue de leur activité antibactérienne, les bactériocines de classe IIa présentent toutes une activité contre des espèces appartenant au genre *Listeria*. Nissen-Meyer *et al.* (2009) ont proposé une classification reposant sur la similarité de séquence des moitiés C-terminales des bactériocines de classe IIa (Figure 2), plus variable que la moitié N-terminale.

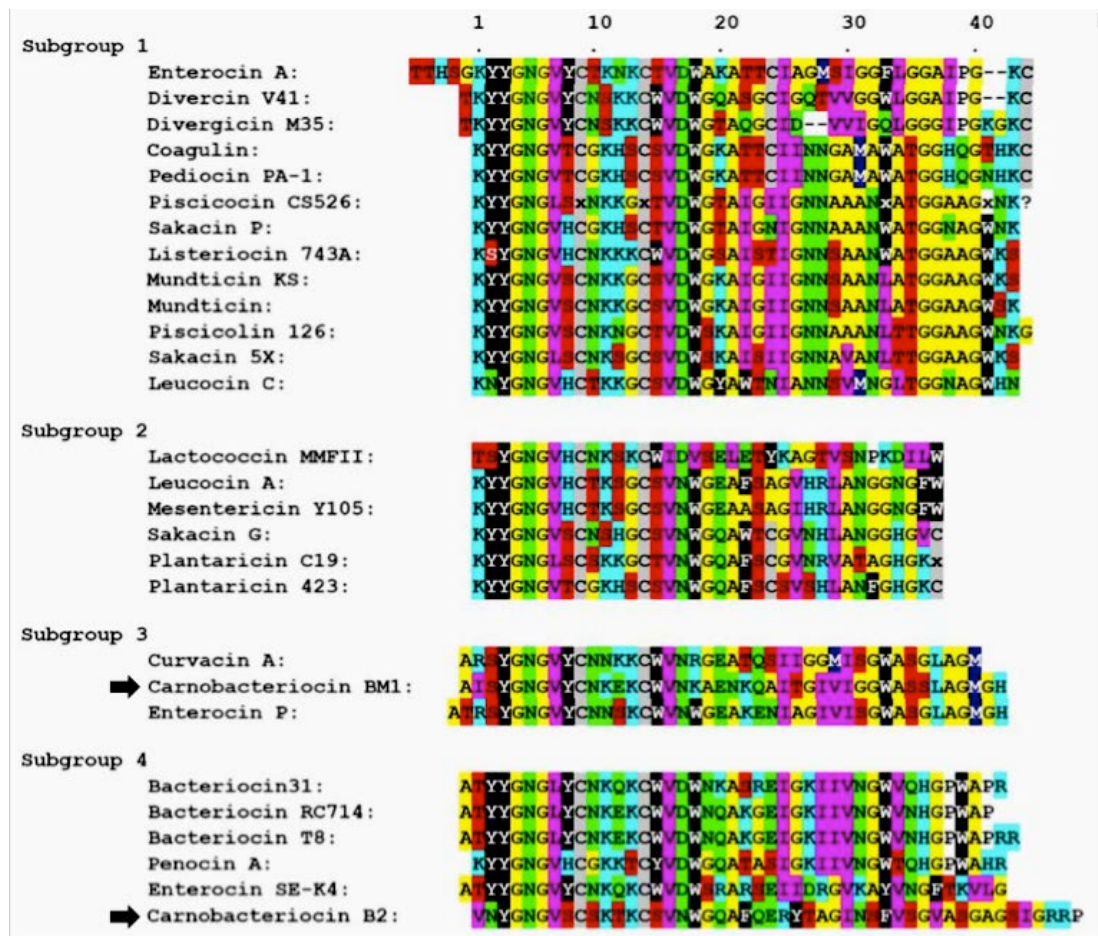


Figure 2. Classification des bactériocines de classe IIa selon Nissen-Meyer *et al.* (2009). Cette classification repose sur les similarités de séquences de la moitié C-terminale des peptides qui est plus variable que la moitié N-terminale. Les carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2 sont indiquées par ➡.

Cette classification conduit à la création de quatre sous-groupes. Les carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2 produites par *C. maltaromaticum* CP5 appartiennent alors respectivement aux sous-groupes 3 et 4 en raison de leurs différences de structures primaires en C-terminal. Ces deux carnobactériocines ont été étudiées et leurs concentrations minimales inhibitrices ont été déterminées (Tableau 6).

Tableau 6. Spectre d'activité et concentrations minimales inhibitrices des carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2 purifiées obtenues par expression hétérologue chez *Escherichia coli* (d'après Jasniewski *et al.*, 2009).

Souches	Concentration minimale inhibitrice (mg.L ⁻¹)	
	Cbn BM1	Cbn B2
<i>Carnobacterium divergens</i> DSM 20623	0,625	1,25
<i>C. gallinarum</i> DSM 4847	0,625	1,25
<i>C. maltaromaticum</i> DSM 20730	0,625	1,25
<i>C. mobile</i> DSM 4848	0,625	1,25
<i>Enterococcus durans</i> CIP 55125	2	2
<i>E. faecalis</i> CIP 76117	2	2
<i>Listeria grayi</i> CIP 6818	4	4
<i>L. innocua</i> CIP 12511	4	4
<i>L. ivanovii</i> CIP 12510	4	4
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	4	4
<i>L. monocytogenes</i> CIP 7831	4	4
<i>L. seeligeri</i> SLCC 3954	4	4

II.2. Production

II.2.1. Synthèse

La production de bactériocines de classe IIa nécessite la présence d'au moins quatre gènes (Nes *et al.*, 2002). Il s'agit du gène codant la pré-bactériocine elle-même, du gène de la protéine d'immunité, d'un gène codant le transporteur nécessaire à la sécrétion et d'un gène codant une protéine dite accessoire dont la fonction est inconnue.

La plupart des gènes de bactériocines de classe IIa sont présents au sein de plasmides, à l'exception des gènes codant pour l'entéroline P, la divercine V41 (Métivier *et al.*, 1998), la sakacine P (Cocolin et Rantsiou, 2007) et pour la carnobactériocine BM1 (Quadri *et al.*, 1994) qui sont localisés au niveau du chromosome. Quelle que soit leur localisation, ces gènes sont regroupés au sein d'opérons qui peuvent être transcrits de façon divergentes (Nes *et al.*, 1996). Dans le cas de la pédiocine PA-1, de la plantaricine 423 et de la coaguline, les quatre

gènes impliqués dans la production de la bactériocine sont groupés au sein d'un opéron unique. Pour d'autres bactériocines, les gènes sont répartis au sein de différents opérons assurant chacun une fonction. Ainsi, un premier opéron comprend le gène codant pour la bactériocine et sa protéine d'immunité, un deuxième comprend les gènes codant pour le système de sécrétion et un troisième sera composé des gènes dédiés à la régulation (Ennahar *et al.*, 1999). Ce dernier opéron forme une cassette dédiée à la transduction du signal et à la régulation composée d'un peptide inducteur, d'une histidine kinase et d'un régulateur de réponse.

L'organisation de ces gènes est très conservée parmi les bactériocines de classe IIa (Feng *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2005; Kawamoto *et al.*, 2002; Métivier *et al.*, 1998; Quadri *et al.*, 1997; Fremaux *et al.*, 1995; van Belkum et Stiles, 1995; Axelsson et Holck, 1995; Venema *et al.*, 1995; Bukhtiyarova *et al.*, 1994; Stoddard *et al.*, 1992; Marugg *et al.*, 1992) avec cependant, deux exceptions concernant le locus de la divercin V41 qui présente une organisation atypique due à des réarrangements génétiques importants (Métivier *et al.*, 1998) et celui de la carnobactériocine BM1 où les gènes codant pour la bactériocine et sa protéine d'immunité sont chromosomiques alors que ceux impliqués dans la régulation et la sécrétion sont plasmidiques (Figure 3) (Rohde et Quadri, 2006; Quadri *et al.*, 1997).

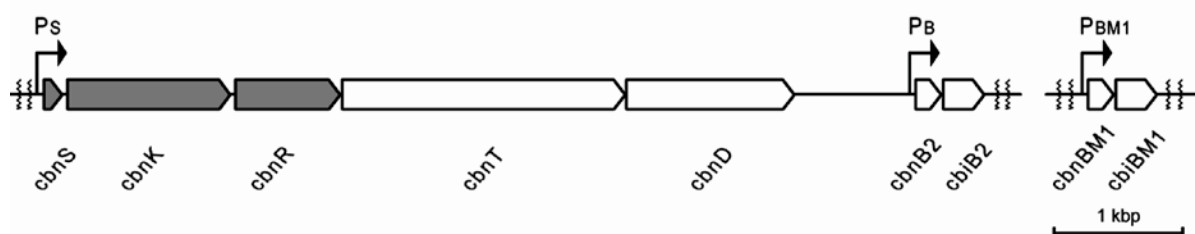


Figure 3. Loci impliqués dans la production des carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2 et de leur immunité. Le locus situé sur le plasmide pCP40 (à gauche) est composé de la cassette de régulation à trois composants (*cbnS* (auto-inducteur)-*cbnK* (histidine protéine kinase)-*cbnR* (régulateur)), les gènes codant le système de sécrétion (*cbnT* et *cbnD*), le gène codant pour le précurseur de la carnobactériocine B2 (*cbnB2*) et le gène codant pour la protéine d'immunité de la carnobactériocine B2 (*cbiB2*). Le locus chromosomique (à droite) est composé du gène codant pour le précurseur de la carnobactériocine BM1 (*cbnBM1*) et celui codant pour la protéine d'immunité de la carnobactériocine BM1 (*cbiBM1*). Les promoteurs P_S , P_B et P_{BM1} sont indiqués par une flèche. (D'après Rohde et Quadri, 2006).

II.2.2. Sécrétion

Les bactériocines de classe IIa sont tout d'abord synthétisées sous forme d'un pré-peptide présentant une très faible activité anti-bactérienne (Nes *et al.*, 1996) qui sera clivé

lors de son excrétion dans le milieu extra-cellulaire, libérant ainsi la bactériocine et un petit peptide dit peptide « leader » responsable de la sécrétion et de la maturation du pré-peptide. Une étude sur la structure tridimensionnelle de la pré-carnobactériocine B2 a montré que le peptide « leader » pouvait empêcher les interactions entre la bactériocine et la membrane bactérienne en se repliant et en interagissant avec l'hélice α (Sprules *et al.*, 2004).

Le peptide leader aurait également un second rôle impliqué dans la reconnaissance de la pré-bactériocine par le transporteur de type ABC (« *ATP Binding Cassette* »). Le clivage du pré-peptide est réalisé directement par l'activité protéolytique du domaine N-terminal transporteur de type ABC (Aucher *et al.*, 2005 ; Håvarstein *et al.*, 1995) au niveau du motif GG (Ennahar *et al.*, 2000 ; Franke *et al.*, 1999). La vitesse de sécrétion ainsi que l'efficacité du clivage par le transporteur dépend de la séquence primaire du peptide leader (Aucher *et al.*, 2005). De même, des mutations ponctuelles peuvent conduire au blocage du système de sécrétion bien que certaines mutations ainsi que des séquences provenant d'autres bactéries puissent être tolérées (Axelsson *et al.*, 1998 ; van Belkum *et al.*, 1997).

Il est à noter que la sécrétion de certaines bactériocines de classe II fait appel au système général de sécrétion Sec : il s'agit de la divergicine A (Worobo *et al.*, 1995), de l'acidocine B (Leer *et al.*, 1995), ou encore de l'entérotoxicine P (Cintas *et al.*, 1997). Ces bactériocines présentent des peptides leader très différents de ceux reconnus par les transporteurs de type ABC (Nes *et al.*, 2002). Il a été montré que le remplacement d'un peptide leader reconnu par un transporteur de type ABC par un peptide leader reconnu par le système Sec n'entraîne alors qu'une faible modification de l'excrétion de la bactériocine (Biet *et al.*, 1998 ; McCormick *et al.*, 1996).

II.2.3. Régulation de la production

La production des bactériocines de classe IIa fait appel à un système de « *quorum sensing* » à trois composants (Miller et Bassler, 2001). Le fonctionnement de ce système repose sur un peptide inducteur, une histidine kinase transmembranaire et un régulateur de la réponse qui est situé dans le cytoplasme.

Le peptide inducteur est synthétisé par voie ribosomale sous forme d'un pré-peptide qui va être, à l'instar des bactériocines de classe IIa, clivé et secrété par un transporteur de type ABC (Nes et Eijsink, 1999). A partir d'une concentration seuil en peptide extra-cellulaire, il y a activation de l'histidine kinase transmembranaire qui s'autophosphoryle au niveau d'un résidu histidine situé côté cytoplasme (Kristiansen *et al.*, 2005). Cette forme

activée de l'histidine kinase va alors pouvoir trans-phosphoryler un résidu aspartate du régulateur de réponse qui va jouer alors le rôle d'activateur transcriptionnel du gène de la bactériocine. Le régulateur de réponse va parallèlement activer la transcription des gènes codant pour les protéines impliquées dans le système à trois composants, conduisant ainsi à une boucle d'auto-activation conduisant à l'augmentation de la production de bactériocines.

L'implication d'un mécanisme de type « *quorum sensing* » dans la production de bactériocines a été mis en évidence chez *C. maltaromaticum* (van Belkum *et al.*, 2007 ; Gursky *et al.*, 2006 ; Rohde *et al.*, 2006) (Figure 4). Ainsi, les carnobactériocines BM1 et B2 sont synthétisées sous forme de prébactériocines et sécrétées par un même transporteur de type ABC (CbnT/CbnD). Lors du transport les peptides sont clivés libérant ainsi un peptide signal (Cbn S). Ce dernier, ainsi que les deux bactériocines, vont être reconnus par une protéine kinase (Cbn K) qui va alors recruter et phosphoryler une protéine régulatrice (Cbn R). La protéine régulatrice va alors activer la transcription des gènes codant pour les bactériocines.

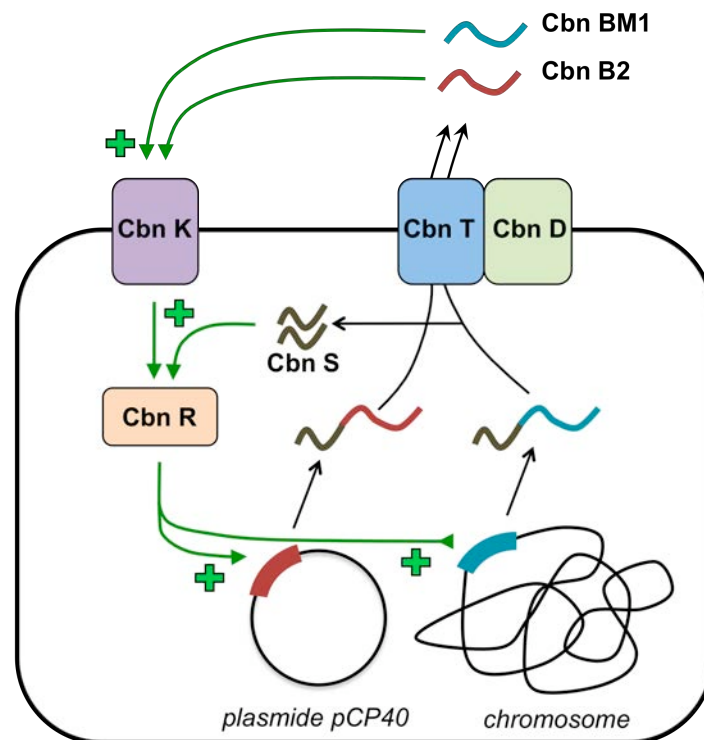


Figure 4. Régulation par « *quorum sensing* » des carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2 chez *Carnobacterium maltaromaticum* (adapté d'après Quadri, 2003). CbnT/CbnD : transporteur transmembranaire, Cbn K : protéine kinase, Cbn R : protéine régulatrice, Cbn S : peptide signal.

Parallèlement à une régulation par *quorum sensing*, de nombreuses bactériocines de classe IIa présentent également une régulation en fonction de facteurs environnementaux tels

que la température, la force ionique ou encore le pH (Gursky *et al.*, 2006 ; Cintas *et al.*, 1997 ; Fimland *et al.*, 2000 ; Diep *et al.*, 2000 ; Leroy et de Vuyst, 1999).

II.3. Structures et fonctions des différentes régions

La structure des bactériocines de classe IIa peut être divisée en deux domaines : un domaine N-terminal hydrophile très conservé et un domaine C-terminal plus variable (Fimland *et al.*, 1996). Les données structurales obtenues par résonnance magnétique nucléaire (Diep *et al.*, 2000 ; Fregeau Gallagher *et al.*, 1997 ; Wang *et al.*, 1999) et par dichroïsme circulaire (Kaur *et al.*, 2004 ; Watson *et al.*, 2001 ; Fleury *et al.*, 1996) montrent que le domaine N-terminal présente une structure en feuillet β alors que le domaine C-terminal adopte une structure en hélice α . Différents travaux reposant sur le remplacement d'acides aminés ont été également menés afin d'en déduire leur implication dans la relation structure-fonction des bactériocines de classe IIa (Tominaga et Hatakeyama, 2006 ; Morisset *et al.*, 2004 ; Kazazic *et al.*, 2002 ; Fimland *et al.*, 2000 ; Johnsen *et al.*, 2000 ; Miller *et al.*, 1998a).

II.3.1. Structuration en milieux apolaire

Quatre structures tridimensionnelles de bactériocines de classe IIa sont connues : celles de la leucocine A (Fregeau Gallagher *et al.*, 1997), de la carnobactériocine B2 (Wang *et al.*, 1999 ; Sprules *et al.*, 2004), de la sakacine P (Uteng *et al.*, 2003) et de la curvacine A (Haugen *et al.*, 2005). Les bactériocines de classe IIa ne présentent pas de structuration en milieu polaire mais au sein d'un environnement mimant les membranes (trifluoroéthanol, micelles de dipalmitoylcholine ou de sodium dodécylsulfate), ces peptides adoptent une structuration tridimensionnelle. Ainsi, la région N-terminale va former un feuillet β antiparallèle incluant un pont di-sulfure. La région C-terminale, quant à elle, va former une ou deux hélices α amphiphiles suivie(s) d'une extrémité pouvant se replier vers la ou les hélices α , formant ainsi une structure dite « en épingle à cheveux ». Cette structuration en milieu apolaire et, par extension, au contact de la membrane plasmique est directement liée à l'activité des bactériocines de classe IIa (Ennahar *et al.*, 2000).

II.3.2. Région N-terminale

La région N-terminale des bactériocines de classe IIa présente une charge électrostatique positive et est constituée de deux éléments structuraux importants : un feuillet β et un pont di-sulfure.

Charge électrostatique

La majorité des acides aminés chargés positivement sont situés au niveau de la région N-terminale des bactériocines de classe IIa. Différents travaux ont montré le rôle important de ces résidus dans les interactions électrostatiques avec la membrane qui constitueraient la première étape du mécanisme d'action (Chen *et al.*, 1997a ; Kazazic *et al.*, 2002 ; Uteng *et al.*, 2003).

Feuillet bêta et motif « YGNGV »

Situé au niveau du feuillet β (Watson *et al.*, 2001) de cette région N-terminale, le motif YGNGV a été longtemps considéré comme responsable de l'activité anti-*Listeria* du fait de l'ubiquité de ce motif et de cette activité au sein des bactériocines de classe IIa. Cette idée semblait être confirmée par une diminution, voire une perte totale, d'activité en cas de modification de ce motif. Ainsi, le remplacement du résidu tyrosine en troisième position par un résidu phénylalanine au sein de la carnobactériocine B2 (Quadri *et al.*, 1997), ainsi que le remplacement de l'asparagine en cinquième position par une lysine au sein de la pédiocine PA-1 (Miller *et al.*, 1998), entraîne une diminution notable de leur activité. Cependant, certaines bactériocines de classe IIa présentent des altérations au niveau de ce motif et possèdent tout de même une activité anti-*Listeria* : c'est le cas de l'acidocine A (Kanatani *et al.*, 1995), de la bactériocine 31 (Tomita *et al.*, 1996) ou encore de la piscicocine CS526 (Suzuki *et al.*, 2005). Ceci semble donc indiquer que le motif YGNGV n'est pas, du moins seul, responsable de l'activité ciblant les bactéries du genre *Listeria*. Il a été proposé que le feuillet β puisse assurer le bon positionnement du motif YGNGV lors du contact soit avec la membrane, soit avec un éventuel récepteur (Fleury *et al.*, 1996 ; Fregeau Gallagher *et al.*, 1997). D'autres auteurs considèrent à l'inverse que le motif YGNGV servirait à structurer le feuillet β et, par conséquent, à grouper les acides aminés cationiques afin de favoriser l'interaction du peptide avec les têtes polaires des phospholipides membranaires (Chen *et al.*, 1997a,b ; Fimland *et al.*, 1996).

Miller *et al.* (1998b) ont construit une protéine de fusion entre la pédiocine PA-1/AcH et la « *Maltose Binding Protein* » située en N-terminal. Cette protéine de fusion conservant

une activité antibactérienne, il a été suggéré que la région N-terminale ne pénétrait pas au sein de la membrane bactérienne.

Ponts di-sulfures

Pour certaines bactériocines, la présence d'un pont di-sulfure apparaît comme étant indispensable à l'activité antibactérienne du peptide (Bhugaloo-Vial *et al.*, 1999 ; Hastings *et al.*, 1991) alors que dans d'autres cas, une telle réduction conduit uniquement à une faible diminution de cette activité (Simon *et al.*, 2002 ; Hastings *et al.*, 1991). De plus, des études comparatives ont montré que les bactériocines possédant deux ponts di-sulfures présentent une activité accrue ainsi qu'un spectre d'action plus large que celles n'en possédant qu'un seul (Richard *et al.*, 2006 ; Jack *et al.*, 1995). Ainsi, un variant de la sakacine P où un pont di-sulfure est introduit dans la région C-terminale présente un spectre d'action plus large et une activité plus grande à des températures élevées (Fimland *et al.*, 2000).

Région C-terminale

La région C-terminale joue un rôle important dans la détermination du spectre d'activité des bactériocines de classe IIa (Fimland *et al.*, 1996). Ceci a été montré par construction de peptides hybrides combinant les régions N- et C-terminales de différentes bactériocines de classe IIa. Les peptides hybrides ainsi obtenus présentent le même spectre d'activité que la bactériocine dont la région C-terminale est utilisée. De même, l'inhibition compétitive de l'activité de la pédiocine PA-1/AcH par un fragment de 15 acides aminés (résidus 20 à 34) de ce même peptide confirme l'hypothèse de la reconnaissance de la bactérie cible par la région C-terminale de la bactériocine (Fimland *et al.*, 1998). Afin d'approfondir la compréhension du lien entre la structure et l'activité de la région C-terminale, (Rihakova *et al.*, 2009) ont produit par mutagenèse dirigée des variants de la divercin RV41. L'ensemble des huit mutants ainsi obtenus présente une activité antibactérienne amoindrie contre *Listeria monocytogenes* EGDe et *Enterococcus faecalis* JH2-2 par rapport à la divercin RV41 bien que leurs structures tridimensionnelles ne soient que très peu modifiées. Ainsi, il apparaît que les chaînes latérales des acides aminés présents dans cette région jouent un rôle majeur, plus que la structuration en elle-même, dans l'activité de la bactériocine.

La structure en épingle à cheveux que présente l'extrémité C-terminale des bactériocines de classe IIa est variable en taille et en composition et est capable de pénétrer suivant une orientation oblique au sein de la membrane (Ennahar *et al.*, 2000 ; Fimland *et al.*,

1996 ; Fimland *et al.*, 2005 ; Uteng *et al.*, 2003 ; Miller *et al.*, 1998b ; Moll *et al.*, 1999 ; Morisset *et al.*, 2004).

Hélice alpha

Les bactériocines de classe IIa adoptent une structuration en hélice α lorsqu'elles sont placées en présence de membranes plasmiques ou de solutions les mimant (Fregeau Gallagher *et al.*, 1997). L'hélice α s'insérerait de façon oblique au sein de l'interface hydrophile/hydrophobe de la membrane. Cette orientation faciliterait alors la pénétration (Bennik *et al.*, 1998) et, par conséquent, la perturbation de la membrane. Une analyse du rôle de chaque acide aminé constituant l'hélice dans l'activité de la pédiocine PA-1 a été réalisée (Haugen *et al.*, 2011), montrant le rôle important des résidus K1, A2, T4, N8 et A15.

Résidus Tryptophane

Les bactériocines de classe IIa présentent généralement deux résidus tryptophane très conservés. Parmi celles qui ne présentent qu'un seul résidu tryptophane, un résidu phénylalanine remplace le second tryptophane dans la moitié des cas. La carnobactériocine Cbn BM1 présente deux résidus tryptophane au sein de sa structure primaire (W16 et W31). Une forte diminution de l'activité antibactérienne est observée en cas de remplacement du tryptophane central de la pédiocine PA-1 (Miller *et al.*, 1998) et de la mésentéroïne Y105 (Fleury *et al.*, 1996). La sakacine P quant à elle présente trois résidus tryptophane et le remplacement de chacun de ces résidus a été réalisé conduisant à une altération de l'activité (Fimland *et al.*, 2002). De même concernant la mésentéroïne Y105 (Morisset *et al.*, 2004), la substitution du résidu Trp37 par un résidu phénylalanine entraîne une diminution de l'activité bien que sa structuration en hélice ne soit pas affectée. D'autres travaux sur ce même peptide ont montré que les deux résidus tryptophane s'insèrent au sein de la bicouche phospholipidique de vésicules lipidiques (Castano *et al.*, 2005). Le résidu Trp18 serait alors situé de manière plus profonde au sein de la bicouche que le résidu Trp37 qui serait également responsable de l'affinité pour les lipides chargés négativement (Castano *et al.*, 2005).

II.4. Mécanismes d'action

Bien que les différentes bactériocines de classe IIa présentent de fortes similarités structurales (**Figure 2**) leurs spectres d'activité présentent des différences importantes. Les

bactéries inhibées dans leur croissance sont en général phylogénétiquement proches de la souche productrice. Ainsi, il a été montré que la concentration minimale inhibitrice des bactériocines Cbn BM1 et Cbn B2 était plus faible pour des souches appartenant au genre *Carnobacterium* qu'aux genres *Listeria* et *Enterococcus* (Jasniewski *et al.*, 2009). Cependant, quelle que soit la bactériocine considérée, les bactéries appartenant au genre *Listeria* sont toujours inhibées.

II.4.1. Facteurs modulant l'activité

Malgré la difficulté à comparer les différentes études du fait des différences de détermination du titre (concentration molaire ou unité arbitraire d'activité) et de conditions expérimentales retenues, il apparaît toutefois que différents paramètres influencent l'activité d'une même bactériocine sur une bactérie cible.

Mise en évidence de l'activité antibactérienne

Afin de mettre de évidence l'activité antibactérienne de bactériocines, deux types d'essais sont classiquement réalisés. Le premier consiste à déposer la solution à tester sur un milieu gélosé ensemencé avec une souche bactérienne indicatrice (Bonev *et al.*, 2008). La solution va alors diffuser et, si la solution présente une activité antibactérienne, une zone d'inhibition de croissance sera visible autour de la zone de dépôt. La limite majeure de cette approche repose sur la capacité qu'a le composé antimicrobien à diffuser dans le milieu solide. La diffusion est gouvernée par la taille du composé (masse moléculaire et rayon de giration) ainsi que par son hydrophobicité. D'autres paramètres vont également jouer un rôle important dans ce test comme le temps de diffusion, la température à laquelle celle-ci est réalisée et la présence d'autres composés, tels que de détergents comme le Tween80, pouvant influencer cette diffusion. Afin d'obtenir des données précises concernant des activités antibactériennes à partir de ce type de test, des modèles complexes de diffusion ont été développés (Pearson *et al.*, 1980). Il est donc très probable de sous-estimer l'efficacité de composés antibactériens en faisant appel aux tests de diffusion en milieu solide. Une seconde approche est également très couramment utilisée : la mesure d'inhibition de croissance en milieu liquide. Cette approche est utilisée pour déterminer macroscopiquement les concentrations minimales inhibitrices des différents composés antibactériens (C.M.I.) (Andrews *et al.*, 2001). La C.M.I. d'un composé correspond à la concentration la plus faible en composé où l'inhibition de la croissance de la souche indicatrice est visible à l'oeil nu après 24h de culture. Avec cette approche, il est alors

impossible de détecter une activité pour des composés n'induisant que des inhibitions de croissance transitoires et à court terme. De même, cette approche ne permet en rien de discriminer un mode d'action bactériostatique d'un mode d'action bactéricide non lytique.

Les deux méthodes présentées, bien que représentant les tests les plus utilisés, ne sont pas totalement appropriés pour l'étude des bactériocines de classe IIa. En effet, de nombreux paramètres tels que le pH, la quantité d'ions divalents ou la présence de détergents modulent leur activité (Gänzle *et al.*, 1999 ; Chikindas *et al.*, 1993 ; Buhnia *et al.*, 1991). Concernant le mode d'action de Cbn BM1, une reprise de croissance est observable après quelques heures d'inhibition (Jasniewski *et al.*, 2008) et la détermination classique de la C.M.I. ne permet pas d'expliquer un tel phénomène. En effet, les tests classiques ne permettent pas de déterminer si une telle reprise de croissance est due à un effet bactériostatique transitoire de la bactériocine ou si la croissance observable est due à la croissance de variants résistants au sein de la population totale.

Facteurs environnementaux

L'activité observable des bactériocines peut être modulée par les paramètres physico-chimiques. Il est toutefois difficile de discerner si les différences d'activité mesurées entre les différentes conditions expérimentales sont dues à la bactériocine elle-même (état de charge, repliement, agrégation...) ou à d'autres paramètres tels que sa diffusion dans le milieu utilisé ou la présence d'autres composés pouvant agir en synergie avec elles.

Parmi les différentes méthodologies employées dans la détermination de l'activité des bactériocines, le test d'inhibition en milieu solide est fréquemment utilisé. Différents paramètres peuvent influencer la diffusion de l'activité observable des bactériocines. Parmi ceux-ci figurent la concentration en agar qui peut varier de 6 g.L⁻¹ à 15 g.L⁻¹ (Vignolo *et al.*, 1996 ; Arihara *et al.*, 1996) et la durée de la diffusion à 4 °C qui peut être nulle ou s'étendre jusqu'à dix huit heures (Joosten *et al.*, 1996 ; Huot *et al.*, 1996 ; Kaiser et Montville, 1996 ; Vignolo *et al.*, 1995 ; Arihara *et al.*, 1996). L'ajout d'un détergent, le Tween 80, est parfois utilisé afin d'augmenter la diffusion de la bactériocine dans le milieu gélosé (Joosten *et al.*, 1996). Cependant, il est à noter que ce composé pourrait également empêcher l'adsorption des bactériocines sur certains matériaux ou encore perturber les membranes bactériennes des bactéries cibles, ce qui pourrait contribuer à une activité antibactérienne observable accrue. Les travaux de Blom *et al.* (1997) ont comparé l'influence de cinq paramètres que sont le pH, la concentration en NaCl, la concentration en agar, l'inoculum bactérien et la présence d'huile

de soja sur l'activité de quatre bactériocines : la sakacine A, la sakacine B, la pédiocine PA-1 et la piscicoline 61. Les résultats de cette étude montrent que l'influence de ces paramètres était différente en fonction de la bactériocine étudiée. Le pH est un paramètre important dans la modulation de l'activité des bactériocines de classe IIa. La pédiocine PA-1 ainsi que la bavaricine MN présentent une activité maximale à pH acide (Kaiser *et al.*, 1996). En effet, il est admis que l'activité des bactériocines fait intervenir des liaisons électrostatiques entre les charges positives des peptides et la surface des bactéries cibles. L'activité du peptide dépend donc de l'état d'ionisation des chaînes latérales des acides aminés et, par conséquent, du pH. La réduction de l'activité de bactériocines en présence de cations divalents (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} et Ba^{2+}) (Gänzle *et al.*, 1999) semble confirmer le lien entre l'activité du peptide et les liaisons électrostatiques que ce dernier doit établir avec la bactérie cible.

Facteurs biotiques

L'activité des bactériocines de classe IIa est également modulée par certaines propriétés des bactéries cibles, et notamment de leur enveloppe. (Vadyvaloo *et al.*, 2002) ont établi un lien entre la résistance de *L. monocytogenes* à la leucocine A et à la pédiocine PA-1 et la teneur en phosphatidylglycérol des membranes bactériennes. Cette étude révèle une augmentation du ratio entre phosphatidylglycérol insaturés et saturés et entre ceux à courtes chaînes et à longues chaînes chez toutes les souches résistantes de *L. monocytogenes* (Vadyvaloo *et al.*, 2002). D'autres travaux ont montré l'implication de la teneur en D-alanine des acides téichoïques et de la charge électrostatique dans la sensibilité de *L. monocytogenes* aux bactériocines de classe IIa (Vadyvaloo *et al.*, 2004). La composition membranaire en acide gras, notamment en $C_{16:0}$, intervient également dans la sensibilité de *L. monocytogenes* à la divergicine M35 (Naghmouchi *et al.*, 2007). Cependant, la composition en acides gras de la membrane de souches de *Leuconostoc* et de *Weissella* résistantes à la mésentéroline 52A ne diffère pas de celle des souches sensibles d'origine (Limonet *et al.*, 2002). Les analyses par infra-rouge à transformée de Fourier réalisées ont montré que la perte de sensibilité de *L. monocytogenes* vis-à-vis de la sakacine P résulte d'un changement global de la composition de l'enveloppe bactérienne (Tessema *et al.*, 2009).

II.4.2. Adsorption : directe ou via un récepteur

Des travaux portant sur la poration de liposomes par la pédiocine PA-1/AcH ont conduit les auteurs à émettre l'hypothèse de l'existence d'un récepteur ou d'une molécule

d'ancrage nécessaire à une activité optimale de ce peptide. En effet, la concentration en bactériocine nécessaire pour créer des fuites de carboxyfluorescéine à partir de liposomes artificiels était supérieure à celle requise pour des liposomes issus de membranes de bactéries sensibles (Chen *et al.*, 1997a,b). L'hypothèse de l'existence d'un tel récepteur s'est confirmée par la mise en évidence de l'inhibition de l'activité de la pédiocine PA-1/AcH par un fragment de quinze acides aminés correspondant au domaine C-terminal de cette bactériocine (Fimland *et al.*, 1998). Il y aurait donc compétition entre la fixation du fragment et de la bactériocine entière diminuant ainsi l'activité effective de la bactériocine. Les interactions entre un composé et son récepteur étant des processus chiraux, un énantiomère de la leucocine A entièrement constitué d'acides aminés de la forme D a été construit (Yan *et al.*, 2000). Cette forme de bactériocine de classe IIa ne présente aucune activité antibactérienne, confirmant ainsi l'implication d'interactions chirales dans le mécanisme d'action de la leucocine A et, par conséquent, d'un récepteur. La mise en évidence d'une corrélation entre le niveau d'expression de l'opéron *mpt*, codant pour une mannose perméase, et le niveau de sensibilité d'*Enterococcus faecalis* et de *Listeria monocytogenes* à la mésentéricine Y105 (Dalet *et al.*, 2001 ; Héchard *et al.*, 2001) a conduit à la conclusion que le récepteur des bactériocines de classe IIa est la mannose perméase. Cette mannose perméase appartient au système phosphotransférase responsable de l'import et de la phosphorylation de glucides chez des bactéries Gram positives et négatives (Postma *et al.*, 1993). L'expression hétérologue de l'opéron *mptACD*, codant pour la mannose perméase, chez une souche de *Lactococcus lactis* confère à cette dernière une sensibilité à différentes bactériocines de classe IIa (Ramnath *et al.*, 2004). De même, la délétion du gène *lmo0095*, codant pour un activateur de l'expression de la mannose perméase, conduit à une augmentation de la résistance de *Listeria monocytogenes* à la pédiocine AcH (Vu-Khac et Miller, 2009). La construction d'une banque de mutants de *Listeria innocua* a permis de confirmer l'existence d'un lien entre l'absence d'expression de l'opéron *mpt* et une forte résistance à la pédiocine AcH (mille fois supérieure à la souche sauvage) (Xue *et al.*, 2005). De même, une analyse transcriptionnelle portant sur l'ensemble des gènes de souches mutantes d'*Enterococcus faecalis* V583 résistantes à la pédiocine PA-1 a révélé que l'expression de l'opéron *mpt* apparaît réduite chez les mutants et que l'expression d'environ deux cents gènes, pour la plupart impliqués dans le métabolisme énergétique et les transports, était modifiée (Opsata *et al.*, 2010).

La seule expression du gène *mptC* étant suffisante pour conférer une sensibilité à *Lactococcus lactis* (Ramnath *et al.*, 2004), il a donc été proposé que la sous unité C de la mannose perméase constituait le récepteur aux bactériocines de classe IIa. Ceci a été confirmé

par une étude récente montrant que la reconnaissance de l'interaction entre les bactériocines de classe IIa et la mannose perméase était due à une boucle extracellulaire de la sous-unité C (Kjos *et al.*, 2010).

Les précédentes études ont donc conduit à valider le rôle de la mannose perméase en tant que récepteur des bactériocines de classe IIa. Bien que fortement étayée, cette hypothèse peut paraître insuffisante. En effet, de nombreuses bactéries présentent au moins une perméase de ce type au sein de leur génome et, cependant, les bactériocines présentent un spectre d'action plutôt étroit, souvent composé de bactéries phylogénétiquement proches de la souche productrice. C'est en se basant sur ce constat qu'une étude phylogénétique a été réalisée sur un grand nombre de mannose perméases issues d'un large panel de genres bactériens (Kjos *et al.*, 2009). Cette analyse a conduit à répartir les perméases au sein de trois clusters dont il apparaît qu'un seul regrouperait les mannose-perméases pouvant servir de récepteur aux bactériocines de classe IIa.

Malgré le nombre croissant de travaux prouvant le rôle de la mannose perméase comme récepteur, d'autres études tendent à montrer que la présence d'un récepteur n'est ni nécessaire ni la seule explication quant à la sensibilité aux bactériocines de classe IIa. Ainsi, des travaux portant sur les interactions entre la pédiocine PA-1 et des liposomes montrent qu'elles reposent sur des phénomènes électrostatiques et non sur la reconnaissance du motif *consensus* YGNGV (Chen *et al.*, 1998 ; Chen *et al.*, 1997a). Confirmant une possible activité des bactériocines en absence de récepteur, les mêmes auteurs ont montré que la fuite de carboxyfluorescéine contenue dans des liposomes était proportionnelle à la quantité de bactériocine (Chen *et al.*, 1997b). De plus, des analyses de la paroi de souches de *L. monocytogenes* résistantes aux bactériocines de classe IIa ont révélé que cette dernière était due à des modifications de la composition de la membrane en acides gras (Naghmouchi *et al.*, 2006 ; Vadyvaloo *et al.*, 2002), de sa D-alanylation et de sa lysinilation (Vadyvaloo *et al.*, 2004). Une étude récente a montré que parmi trente souches mutantes de *L. monocytogenes* résistantes à la sakacine P, le niveau d'expression de la mannose perméase pouvait être soit augmenté, soit diminué (Tessema *et al.*, 2009). Cette étude suggère donc que malgré la corrélation déjà établie entre le taux d'expression de la mannose perméase et la sensibilité aux bactériocines de classe IIa, d'autres facteurs sont impliqués dans la sensibilité et les mécanismes d'action des bactériocines.

II.4.3. Différents modèles de mécanismes d'action membranaire

Les différentes études portant sur les peptides à activité antibactérienne ont conduit à la description de trois modèles de formation de pores dans les membranes bactériennes : le modèle en "douves de tonneau", le modèle en tapis et le modèle en pore toroïdal (Brogden, 2005) (Figure 5).

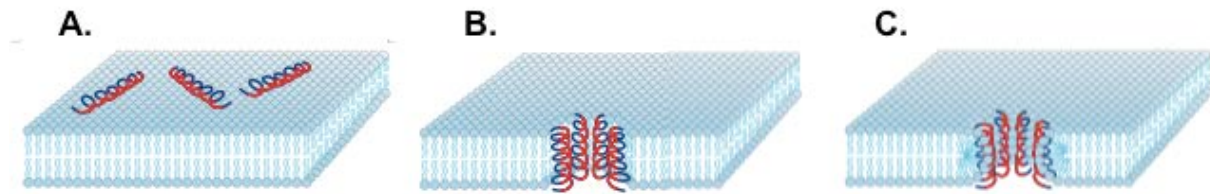


Figure 5. Modèles de mécanismes d'action des peptides antibactériens. A: Modèle en tapis, B: Modèle en douves de tonneau, C: Modèle toroïdal (d'après Brogden, 2005).

Dans le modèle en tapis, les peptides s'accumulent parallèlement à la surface de la membrane par interaction avec les têtes polaires des phospholipides. Dans ce modèle, les peptides pourraient ensuite pénétrer la bicouche lipidique à haute concentration. Dans le modèle en douves de tonneau, les hélices des peptides forment un pore dans la bicouche lipidique en entrant en interaction avec les chaînes hydrophobes des phospholipides. Dans le modèle en pore toroïdal, les peptides demeurent au contact des têtes polaires des phospholipides.

II.4.4. Conséquences de l'action des bactériocines

Changement de la composition membranaire

Une approche par spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier a permis de montrer que BLS P34 induit chez *L. monocytogenes* des changements de spectre dans les régions d'assignement correspondant aux acides gras et aux phospholipides (Motta *et al.*, 2008). Les auteurs en concluent donc le ciblage de la membrane plasmique par BLS P34 produite par *Bacillus* spp. P34.

Atteinte de l'intégrité membranaire

Les bactériocines ciblant les membranes plasmiques des bactéries cibles, ces dernières entraînent donc atteinte de leur intégrité. Afin de mettre ceci en évidence, des essais faisant appel au système "Live/dead BacLight" ont permis de mettre en évidence l'effet antimicrobien

de la leucocine B-TA11a sur *L. monocytogenes* (Swarts *et al.*, 1998).. Ce système est composé de deux sondes fluorescentes : le Syto9® et l'iodure de propidium. La première sonde est capable de traverser librement les membranes et va émettre une fluorescence de couleur verte une fois lié à l'ADN. Cette sonde permet donc de marquer l'ensemble des bactéries. La seconde sonde est capable quant à elle de pénétrer uniquement les bactéries présentant une atteinte de l'intégrité physique des membranes bactériennes. Ces bactéries présenteront alors une fluorescence rouge du fait de l'interaction de l'iodure de propidium avec l'ADN.

Fuites de composés intracellulaires

Les différentes études des mécanismes d'action des bactériocines de classe IIa, qu'elles soient réalisées sur des bactéries ou sur des modèles de membranes tels que les liposomes, ont montré que l'action de cette dernière conduisait à la fuite de composés intracellulaires tels que les ions K^+ , des acides aminés et des molécules de faible poids moléculaire présentant une absorbance dans l'U.V. (Chikindas *et al.*, 1993). Ceci a été mis en évidence pour différentes bactériocines de classe IIa telles que la bavaricine MN (Kaiser et Montville, 1996), l'entéroccine P (Herranz *et al.*, 2001), la mésentéroccine Y105 (Jasniewski *et al.*, 2008a ; Jasniewski *et al.*, 2008b ; Maftah *et al.*, 1993), la mundticine (Bennik *et al.*, 1998), la piscicocine CS526 (Suzuki *et al.*, 2005).

Perturbation de la force protomotrice

Les fuites de composés intracellulaires ainsi que l'interaction des peptides avec la membrane plasmique conduisent à l'altération des fonctions de cette dernière. Ainsi, il a été montré que les bactériocines de classe IIa pouvaient conduire à la perturbation de la force protomotrice de la membrane. La force proto-motrice résulte de deux composantes : le gradient d'ions H^+ , ou ΔpH , et le gradient d'ions K^+ et Na^+ , ou $\Delta \psi$, et l'activité des bactériocines peut perturber soit une seule de ces deux composantes ou bien les deux. Ainsi, la pédiocine PA-1/ACh, la bavaricine MN et la divergicine V41 dissipent les composantes $\Delta \psi$ et ΔpH de *L. monocytogenes* (Bhugaloo-Vial *et al.*, 1999 ; Kaiser et Montville, 1996 ; Chikindas *et al.*, 1993 ; Christensen et Hutkins, 1992). Certaines bactériocines ne perturbent que la composante $\Delta \psi$ de la force protomotrice de la membrane. Il s'agit de la mundticine et de la mésenterocine Y105 sur *L. monocytogenes* (Bennik *et al.*, 1998 ; Maftah *et al.*, 1993), de

la mésentéroïne 52A sur *L. innocua*, *L. ivanovii* et *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (Jasniewski *et al.*, 2008a,b). Herranz *et al.* (2001) ont montré que la perturbation du $\Delta\Psi$ d'*Enterococcus faecium* par l'entéroïne P est dépendante de l'état énergétique de la bactérie.

Perturbation de la fluidité membranaire

Deux études ont montré par mesure d'anisotropie de fluorescence de sondes spécifiques que la fluidité de la membrane plasmique de bactéries appartenant aux genres *Listeria* et *Leuconostoc* pouvait être perturbée par l'action de la mésentéroïne 52A (Jasniewski *et al.*, 2008a,b) (voir la partie dédiée aux mesures de fluidité membranaire).

II.5. Immunité

Les souches bactériennes productrices de bactériocines de classe IIa produisent également des protéines dites d'immunité qui les protègent de l'action de leurs propres peptides (Hühne *et al.*, 1996 ; Axelsson & Holck, 1995 ; Venema *et al.*, 1995 ; Quadri *et al.*, 1997 ; Johnsen *et al.*, 2005 ; Quadri *et al.*, 1995 ; Dayem *et al.*, 1996 ; Fimland *et al.*, 2002 ; Johnsen *et al.*, 2004). La localisation de ces protéines est intracellulaire bien qu'une faible quantité (environ 1%) serait associée à la membrane (Quadri *et al.*, 1995 ; Dayem *et al.*, 1996). La structure primaire d'une vingtaine de protéines d'immunité est connue (Johnsen *et al.*, 2004 ; Sprules *et al.*, 2004 ; Dalhus *et al.*, 2003 ; Johnsen *et al.*, 2005). Ce sont des protéines constituées de 88 à 115 résidus d'acides aminés avec 25% à 35% d'acides aminés chargés. Bien que les gènes codant pour les protéines d'immunité soient généralement localisés à proximité ou au sein du même opéron que le gène codant pour la bactériocine correspondante, certains gènes isolés ont été identifiés (Hühne *et al.*, 1996 ; Métiver *et al.*, 1998 ; Quadri *et al.*, 1994 ; Fimland *et al.*, 2002). Il est supposé que ces derniers confèrent une résistance à des souches non productrices de bactériocines de classe IIa. D'un point de vue structural, une étude de résonance magnétique nucléaire concernant la protéine d'immunité de bactériocine B2 (Sprules *et al.*, 2004), une étude cristallographique concernant celle de l'entéroïne A (Johnsen *et al.*, 2005 ; Dalhus *et al.*, 2003) ainsi que des travaux de modélisation sur d'autres protéines d'immunité (divI-im, leuA-im, et mesY-im) ont été réalisés (Johnsen *et al.*, 2005). Celles-ci sont globulaires et présenteraient toutes un

groupement anti-parallèle de quatre hélices amphiphiles avec un domaine C-terminal flexible en dépit de séquences primaires différentes. Malgré des similarités structurales, ces protéines présentent une grande spécificité en conférant une résistance uniquement à une seule bactériocine, ou éventuellement à d'autres très proches (Johnsen *et al.*, 2005 ; Fimland *et al.*, 2002 ; Johnsen *et al.*, 2004).

Bien que le fonctionnement des protéines d'immunité ne soit pas totalement élucidé, des travaux faisant appel à des bactériocines et des protéines hybrides concluent que l'extrémité C-terminale des bactériocines interagirait avec le domaine C-terminal des protéines d'immunité (Johnsen *et al.*, 2005). Différents auteurs ont également suggéré que l'interaction pouvait être indirecte (Fimland *et al.*, 2005 ; Sprules *et al.*, 2004). Des travaux récents (Diep *et al.*, 2007) ont permis d'approfondir les connaissances concernant le mécanisme d'action d'une protéine d'immunité en montrant qu'elle interagit bien avec la mannose perméase mais seulement si la bactériocine est déjà liée à la perméase. Bien que ce modèle soit en accord avec une localisation intracellulaire de la protéine d'immunité, extracellulaire de la bactériocine, avec la mannose perméase formant le lien entre les deux, il demeure difficile d'expliquer la haute spécificité des protéines d'immunité pour une bactériocine donnée. Il a donc été suggéré que des gènes supplémentaires seraient nécessaires. Cette hypothèse semble être confirmée par les différentes fonctionnalités des protéines d'immunité en fonction des souches dans lesquelles elles sont exprimées (Fimland *et al.*, 2002 ; Johnsen *et al.*, 2004).

III. Propriétés physico-chimiques des surfaces bactériennes

L'enveloppe bactérienne, constituée de la membrane plasmique et du peptidoglycane chez les bactéries Gram-positives, constitue l'interface entre la bactérie et son environnement direct. Cette interface est impliquée dans de nombreux processus physiologiques tels que l'import de nutriments, l'adhésion, la protection face à différents stress (osmotique, thermique) ou encore la division cellulaire. Les bactériocines de classe IIa étant des peptides cationiques, amphiphiles et ne se structurant qu'au sein d'un environnement hydrophobe, leur activité est modulée par différentes propriétés de cette enveloppe bactérienne. En effet, la composition de la membrane plasmique, la longueur des chaînes d'acides gras, la teneur en D-alanine des acides téichoïques ou encore la charge de la membrane bactérienne sont impliquées dans le mécanisme d'action des bactériocines de classe IIa (Naghmouchi *et al.*,

2007 ; Naghmouchi *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2006a ; Vadyvaloo *et al.*, 2004 ; Limonet *et al.*, 2002 ; Vadyvaloo *et al.*, 2002 ; Chen *et al.*, 1998).

D'autres caractéristiques des surfaces bactériennes peuvent être étudiées telles que les propriétés électro-hydrodynamiques, mesurées par détermination des mobilités électrophorétiques, ou les propriétés nano-mécaniques, mesurées par microscopie de force atomique (A.F.M. pour *atomic force microscopy*). Ces méthodologies, issues de l'étude de matériaux et de particules minérales, ont connu des développements théoriques et techniques récents permettant l'étude d'objets biologiques et notamment de bactéries. Il est important de souligner la différence majeure de niveau d'observation existant entre la détermination des propriétés nano-mécaniques bactériennes et l'ensemble des autres méthodes de détermination des propriétés des surfaces bactériennes. En effet, les mesures réalisées par A.F.M. (nano-mécaniques et topologiques) sont réalisées au niveau d'une seule cellule bactérienne alors que l'ensemble des autres méthodes apportent des informations relatives à une population bactérienne. Dans ce second cas, les données obtenues reflètent donc la moyenne des valeurs correspondant à chaque bactérie composant l'échantillon. Ces méthodes ne permettent donc pas de tenir compte de l'éventuelle hétérogénéité ni au niveau de la population étudiée (à l'exception toutefois des mesures de mobilité électrophorétique), ni au niveau de la surface d'une même bactérie. Malgré l'existence de cette limite méthodologique, ce type d'approche s'avère pertinente pour l'étude de la réponse de l'ensemble d'une population suite à l'action, dans notre cas, d'une bactériocine de classe IIa.

III.1. A l'échelle d'une population bactérienne

III.1.1. Composition phospholipidique membranaire

De nombreuses études ont mis en évidence le rôle de la composition lipidique membranaire sur l'activité des bactériocines. Les résultats montrent que l'adsorption de la bactériocine est plus grande en présence de phospholipides anioniques ou, dans une moindre mesure, zwitterioniques (Chen *et al.*, 1998). Les travaux traitant de l'influence de la composition membranaire sur l'activité des bactériocines font appel à deux approches différentes. La première consiste à étudier l'interaction des peptides avec des membranes modèles, le plus souvent des liposomes, afin de maîtriser la composition en phospholipide. Ceci a été réalisé pour la pédiocine PA-1 (Chen *et al.*, 1998), le peptide AS-48 (Abriouel *et*

al., 2001) ou encore la plantaricine (Zhao *et al.*, 2006a). Ce type d'approche ne peut donc pas représenter la complexité du phénomène d'adsorption du peptide *in vivo* mais permet de mettre en évidence le rôle des liaisons électrostatiques dans les interactions entre bactériocine et membrane. La seconde approche repose, quant à elle, sur l'étude de modèles bactériens. La méthodologie retenue consiste à déterminer la composition phospholipidique de la membrane de mutants résistants obtenus à partir de souches sauvages initialement sensibles à une bactériocine. Cette méthode a été réalisée avec des souches de *Leuconostoc* et de *Weissella* vis-à-vis des mésentérocin 52A et 52B (Limonet *et al.*, 2002 ; Limonet *et al.*, 2004), *Listeria monocytogenes* et la divergicine M35 (Naghmouchi *et al.*, 2006) et *Enterococcus faecium* et la mundticin KS (Sakayori *et al.*, 2003). Les résultats alors obtenus montrent des différences de composition en phospholipides entre les souches sensibles et leurs variants résistants. Bien que ce type d'approche soit réalisé *in vivo*, il serait intéressant de déterminer si le changement de composition décrit est la cause directe de la résistance observée. De même, il est probable que, parallèlement à une modification de la membrane plasmique, d'autres modifications puissent avoir lieu notamment au niveau de la paroi bactérienne.

De nombreux auteurs font un lien direct entre la composition phospholipidique déterminée et la fluidité de la membrane. Cependant, différents travaux montrent que, *in vivo*, cette dernière résulte de différents facteurs.

III.1.2. Fluidité membranaire

Les modèles de mécanisme d'action des bactériocines reposant sur l'interaction et/ou la pénétration du peptide dans la membrane, la fluidité de cette dernière pourrait être un paramètre important. Cette fluidité ne peut pas être déduite directement de la composition en phospholipides. En effet, la fluidité est modulée par d'autres composants tels que la cardiolipine ou les protéines membranaires. De même, il a été montré que la présence d'un gradient transmembranaire modulait d'une part la fluidité (Schäffer et Thiele, 2004) et la localisation de certaines protéines membranaires (Strahl et Hamoen, 2010). Il apparaît donc clairement que la fluidité de la membrane est un paramètre complexe et que sa détermination nécessite une méthodologie adaptée.

La fluidité membranaire peut être déterminée à l'aide de sondes fluorescentes spécifiques : le 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH) et le 1-(4-triméthylammoniumphényl)-6-

phényl-1,3,5-hexatriène (TMA-DPH) (Denich *et al.*, 2003 ; Kuhry *et al.*, 1985 ; Kuhry *et al.*, 1983) (Figure 6).

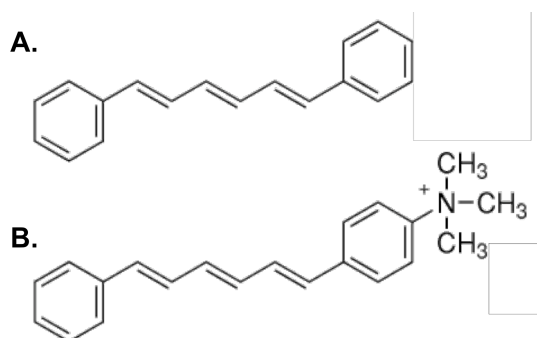


Figure 6. Structure chimique des sondes fluorescentes 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH) (A) et 1-(4-triméthylammoniumphényl)-6-phényl-1,3,5-hexatriène (TMA-DPH) (B).

Ces sondes vont interagir avec la membrane au niveau de sa surface (TMA-DPH) ou du cœur de la bicouche lipidique (DPH). Le déplacement de ces sondes va alors correspondre au déplacement des molécules composant leur environnement direct, c'est-à-dire à la fluidité membranaire. Lorsque ces sondes seront excitées par une lumière polarisée, elles vont émettre un rayonnement lumineux dont la polarisation sera proportionnelle à la fluidité membranaire. En effet, si la sonde est dans un environnement rigide, son émission de fluorescence sera polarisée. A l'inverse, dans un environnement très fluide, l'émission de fluorescence pourra avoir lieu dans toutes les directions, se traduisant alors par une très faible anisotropie de fluorescence. Il est donc possible par la mesure de l'anisotropie de fluorescence de ces sondes de connaître la fluidité membranaire des bactéries.

Les mesures d'anisotropie de fluorescence, dans le domaine d'étude des bactériocines, ont été utilisées par Jasniewski *et al.* afin de déterminer le degré de pénétration des peptides au cœur de la bicouche lipidique. En effet, une augmentation de l'anisotropie de fluorescence du DPH, c'est-à-dire une rigidification du cœur de la bicouche lipidique, traduirait la pénétration de la bactériocine au sein de cette bicouche. Il a été ainsi montré que la mésenterocine 52A pénètre au cœur de la membrane de *Listeria ivanovii* CIP 12510 et de *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* LMA 7. Seule une modification de l'anisotropie de fluorescence du TMA-DPH a été observée après contact de la mésentérocin 52A avec des cellules de *Listeria innocua* CIP 12511 et de *Leuconostoc citreum* CIP 103405, indiquant une action de la bactériocine uniquement à la surface de la membrane (Jasniewski *et al.*, 2008a,b).

III.1.3. Composition de la paroi cellulaire

Des modifications des acides téichoïques de la paroi bactérienne, et notamment leur D-alanylation, interviennent dans la sensibilité des souches à des peptides antibactériens cationiques. La majorité des travaux mettant en évidence une corrélation entre une diminution de la sensibilité et une augmentation de la D-alanylation ont été réalisés avec des bactériocines de classe I et notamment la nisine. Ce lien entre résistance aux lanthibiotiques et D-alanylation a été montré pour *Clostridium difficile* (McBride et Sonenshein, 2011), *Lactococcus lactis* (Kramer *et al.*, 2008), *Streptococcus pneumoniae* (Kovács *et al.*, 2006), *Enterococcus faecalis* (Fabretti *et al.*, 2006) et des *Streptococci* du groupe A (Kristian *et al.*, 2005). Ce lien a également été montré dans le cas de la résistance de *Listeria monocytogenes* aux bactériocines de classe IIa (Vadyvaloo *et al.*, 2004).

III.1.4. Hydrophobicité de surface et caractère acide/base de Lewis

De nombreux phénomènes physiologiques reposent sur l'hydrophobicité de surface et sur le caractère acide/base de Lewis. Le caractère acide/base de Lewis d'une surface bactérienne correspond à sa capacité à donner (acide) ou à accepter (base) des électrons. Ces propriétés de surface ont des implications directes dans les phénomènes d'adhésion (Samot *et al.*, 2011 ; Palmer *et al.*, 2010) et de formation de biofilms (Jacobs et Chenia, 2011). Rawlinson *et al.* (2011) ont mis en évidence que la résistance de *Staphylococcus aureus* vis-à-vis d'un polymère antibactérien cationique reposait également sur l'hydrophobicité de surface de la bactérie.

Théorie Derjaguin Landau Verwey Overbeek

La théorie utilisée pour expliquer l'adhésion de bactéries à des surfaces solides a été historiquement développée pour l'adhésion de colloïdes à des surfaces solides (Marshall *et al.*, 1971). Cette dernière, la théorie Derjaguin Landau Verwey Overbeek (D.L.V.O.), décrit les forces d'interaction entre des surfaces chargées dans un milieu liquide. Elle décrit l'interaction entre une cellule et une surface plane comme un équilibre additif entre les interactions de van der Waals, généralement attractives, et les interactions répulsives résultant

du recouvrement entre les double-couches électriques de la cellule et de la surface. La force de van der Waals correspond à la somme des forces existantes entre des molécules, attractives ou répulsives, autres que celles dues aux liaisons covalentes ou aux interactions électrostatiques. Cette force inclut donc la force entre deux dipôles permanents (ou force de Keesom), la force entre un dipôle permanent et un dipôle induit (force de Debye) et la force entre deux dipôles instantanément induits (force de dispersion de London). Les interactions répulsives découlent de l'interaction de Coulomb entre des molécules chargées. Selon le principe d'électro-neutralité, toute surface chargée est équilibrée par la présence de contre-ions qui vont fortement moduler la force et l'amplitude des interactions répulsives, formant ainsi la couche de Stern. En dehors de cette région, les interactions de la surface, qui n'est pas totalement neutralisée, et les ions en solution vont former une zone où les contre-ions sont accumulés et les co-ions sous-représentés. Au sein de cette zone, définie comme la double couche électrique, plus la distance avec la surface sera grande, plus la concentration en ions va s'approcher asymptotiquement de celle présente dans la solution. Par conséquent, les forces de répulsions résultent de la pression osmotique entre les ions des doubles couches se chevauchant.

Il est à noter que des structures de surface montrées comme impliquées dans l'adhésion des bactéries (lipopolysaccharides, flagelles, *fimbriae*) ne sont pas prises en compte par la théorie D.L.V.O.. Ces structures sont alors discutées en termes de leur contribution dans les propriétés de surface globales de la bactérie notamment en ce qui concerne l'hydrophobicité de surface.

Extension de la théorie Derjaguin Landau Verwey Overbeek par van Oss

L'approche D.L.V.O. ne suffisant pas à rendre compte pleinement des phénomènes d'adhésion bactérienne, il a été proposé par van Oss une extension à la théorie (van Oss, 2006 ; van Oss, 1994). Cette extension inclut deux paramètres : les interactions hydrophobes et les interactions osmotiques, bien que ces dernières soient négligeables dans le cas de cellules. Selon l'auteur, les interactions hydrophobes proviennent de l'énergie des liaisons hydrogènes assurant la cohésion des molécules d'eau. Ces liaisons hydrogènes peuvent être vues comme une interaction entre donneur d'électron et accepteur d'électron, c'est-à-dire comme une interaction acide-base de Lewis. La composante hydrophobe apparaît donc comme relative aux interactions acide-base et serait de dix à cent fois plus fortes que la force de van der

Waals de surfaces en contact direct. Il est important de noter que cette composante décroît exponentiellement à partir de sa valeur maximale.

Cette extension à la théorie initiale a permis d'expliquer les propriétés d'adhésion observées de *Xanthomonas maltophila* (Jucker *et al.*, 1996).

Mesures de l'angle de contact

La mesure de l'angle de contact est la première approche expérimentale faisant appel à la théorie de van Oss. Cette technique consiste à déposer une solution sur une surface et à mesurer l'angle formé entre la tangente de la goutte et la surface de dépôt (Figure 7).

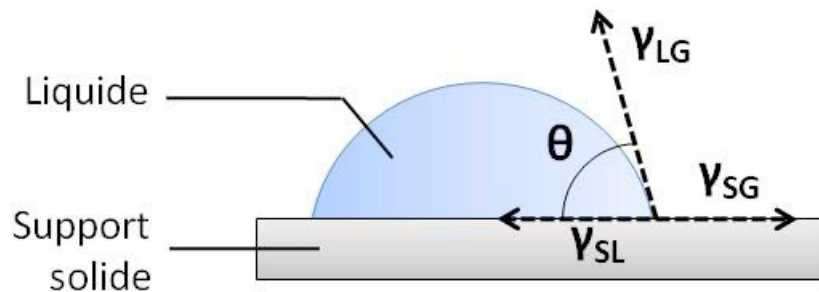


Figure 7. Schéma de la mesure des angles de contact (d'après Förch *et al.*, 2009)

Cet angle, appelé angle de contact (θ), permet d'obtenir trois informations :

- i) *l'affinité du liquide pour la surface* : plus celle-ci est grande, plus l'angle formé par le liquide est petit.
- ii) *l'énergie de surface* en discriminant ses différentes composantes, en utilisant différents liquides de référence.
- iii) *l'homogénéité de la surface* : la rugosité ou des contaminations par exemple peuvent être déterminées en mesurant l'hystérèse entre les angles d'avance et de retrait.

La forme de la goutte déposée est influencée par trois paramètres : la tension de l'interface solide-liquide (γ_{SL}), la tension de l'interface solide-vapeur (γ_{SV}) et la tension de surface liquide-vapeur (γ_{LV}). Ces trois paramètres sont liés à l'angle de contact (θ) par l'équation de Young :

$$-\gamma_{SV} + \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cos\theta = 1 \quad (\text{Équation 1})$$

Seuls la tension de surface liquide-vapeur (γ_{LV}) et l'angle de contact (θ) sont mesurables. Afin de déterminer l'énergie de surface, il faut faire appel à l'équation de Good et van Oss :

$$\gamma_{SV} = \gamma_{SV}^d + 2.(\gamma_{SV}^+ \gamma_{SV}^-)^{1/2} \quad (\text{Équation 2})$$

où γ_{SV}^d est la composante dispersive (interactions de van der Waals), γ_{SV}^+ et γ_{SV}^- sont les composantes polaires (interactions polaires, acide-base de Lewis). Par conséquent :

$$\gamma_{LV}(1 + \cos\theta) = 2((\gamma_{SV}^d \gamma_{LV}^d)^{1/2} + (\gamma_{SV}^+ \gamma_{LV}^-)^{1/2} + (\gamma_{LV}^+ \gamma_{SV}^-)^{1/2}) \quad (\text{Équation 3})$$

En utilisant trois solutions dont les composantes dispersives et polaires sont connues, il est donc possible de calculer l'énergie de surface du solide.

Dans le cas de l'étude des propriétés de surface de bactéries, ces dernières sont séchées afin de constituer la surface de contact et les liquides de référence utilisés sont le 1-bromonaphtalène, le formamide et l'eau (van Oss, 1975). Bien que cette approche soit couramment utilisée (Nguyen *et al.*, 2011 ; Lorite *et al.*, 2011), elle nécessite un ensemble d'équipement dédié à la mesure d'angles de contact.

Une seconde approche, techniquement plus simple et plus rapide, a donc été développée afin de déterminer les propriétés acide-base de Lewis des bactéries : l'adhésion microbienne aux solvants ou M.A.T.S. (pour *microbial adhesion to solvents*) (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996). Cette dernière découle elle-même de la technique d'adhésion aux hydrocarbures (Zilber *et al.*, 1980). La technique consiste à mettre une suspension bactérienne de concentration connue en contact avec différents solvants. Après agitation et séparation des phases, la concentration en bactérie de la phase aqueuse est mesurée et le pourcentage d'adhésion des bactéries aux solvants est calculé. Les solvants utilisés sont comparés par paires constituées d'un solvant monopolaire et d'un solvant apolaire (*n*-alcane) ayant des tensions de surface similaires. Ainsi, les paires de solvants utilisées sont le chloroforme, un solvant acide, et l'hexadécane, le diéthyléther, un solvant basique, et l'hexane, et l'acétate d'éthyle, un solvant basique, et le décane.

La majorité des travaux utilisant le M.A.T.S. concerne l'étude des propriétés d'adhésion des bactéries. Comme exemples, peuvent être cités des travaux concernant l'adhésion de *Lactobacillus* (Samot *et al.*, 2011), de *Listeria monocytogenes* (Takahashi *et al.*, 2010), de *Staphylococcus aureus* et de *Micrococcus luteus* (Zeraik et Nitschke, 2010). Deux études portant sur une bactériocine de classe IIa, la mésentéroïne 52A, ont fait appel à cette méthode afin d'expliquer les phénotypes de résistance/sensibilité par, au moins partiellement, les propriétés de surface des bactéries cibles (Jasniewski *et al.*, 2008a,b). La première a été menée sur *Listeria ivanovii* et *Listeria innocua*, révélant le caractère hydrophile de la surface des deux souches et un caractère acide plus marqué pour la seconde souche. Cette différence de propriétés de surface pourrait être à l'origine de la différence de mécanisme d'action observée entre les deux souches. La seconde étude a été réalisée sur *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides* LMA7, sensible à la mésentéroïne 52A, *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides* LMA7AR, résistant induit, et *Leuconostoc citreum* CIP103405, résistant spontané. L'approche M.A.T.S. a permis de montrer que la surface des deux souches résistantes présente un caractère acide de Lewis beaucoup plus marqué que celui de la souche sensible.

Il est important de noter que les travaux réalisés par Hamadi et Latrache (2008) sur différentes souches de *Staphylococcus aureus*, de *Pseudomonas aeruginosa*, de *Bacillus subtilis* et d'*Escherichia coli* mettent en lumière des différences entre les résultats obtenus par une approche de mesure d'adhésion aux solvants et ceux obtenus par mesure de l'angle de contact. Les résultats de cette étude montrent que, mis à part pour les souches d'*E. coli* testées, la corrélation entre les résultats des deux approches est faible. Ainsi, lorsque par mesure d'angles de contact, un caractère donneur d'électron est identifié, celui-ci est retrouvé par M.A.T.S. mais la réciproque n'est pas forcément observée.

III.1.5. Propriétés électro-hydrodynamiques

D'autres paramètres physico-chimiques des surfaces bactériennes sont impliqués dans de nombreux processus biologiques. Ceux-ci peuvent être déduits du comportement électrophorétique des bactéries en utilisant les outils théoriques adaptés. En effet, ces paramètres ont été initialement étudiés pour des colloïdes dont la phase dispersée présentait une surface imperméable. Suite à de nombreux développements théoriques, ces approches ont

pu être étendues aux bactéries qui présentent des surfaces hétérogènes et molles (le terme sera défini ultérieurement).

Le potentiel électrocinétique ou potentiel ζ

Le paramètre issu des mesures électrocinétiques est le potentiel ζ . Pour aborder la notion de potentiel ζ , il est nécessaire de définir certains concepts relatifs aux systèmes colloïdaux.

Un système colloïdal est constitué d'un composé dispersé, appelé phase interne, au sein d'un autre composé, appelé phase continue. La phase interne doit être dispersée à l'échelle microscopique, présentant généralement un diamètre de 2 à 200 nanomètres. La dispersion d'un composé dans un liquide conduit à la formation d'une double couche électrique. Cette double couche électrique correspond à la présence de deux couches de charges électriques opposées à la surface du composé dispersé (Figure 8). La première couche correspond aux ions composant directement la surface du composé et la seconde couche, quant à elle, est composée d'ions de charge opposée qui vont ainsi neutraliser électriquement la première couche. Cette seconde couche est également appelée couche diffuse du fait de son association faible avec la première couche et du déplacement thermique des ions qui la compose. Cette couche diffuse peut également être divisée en deux parties. La première partie correspond au fluide demeurant attaché à la surface composé dispersé, appelée couche de Stern. La seconde partie correspond au fluide pouvant se déplacer sous l'influence d'une force tangentielle. La séparation entre ces deux zones est nommé « plan de glissement » et le potentiel ζ correspond au potentiel électrique au niveau de ce plan.

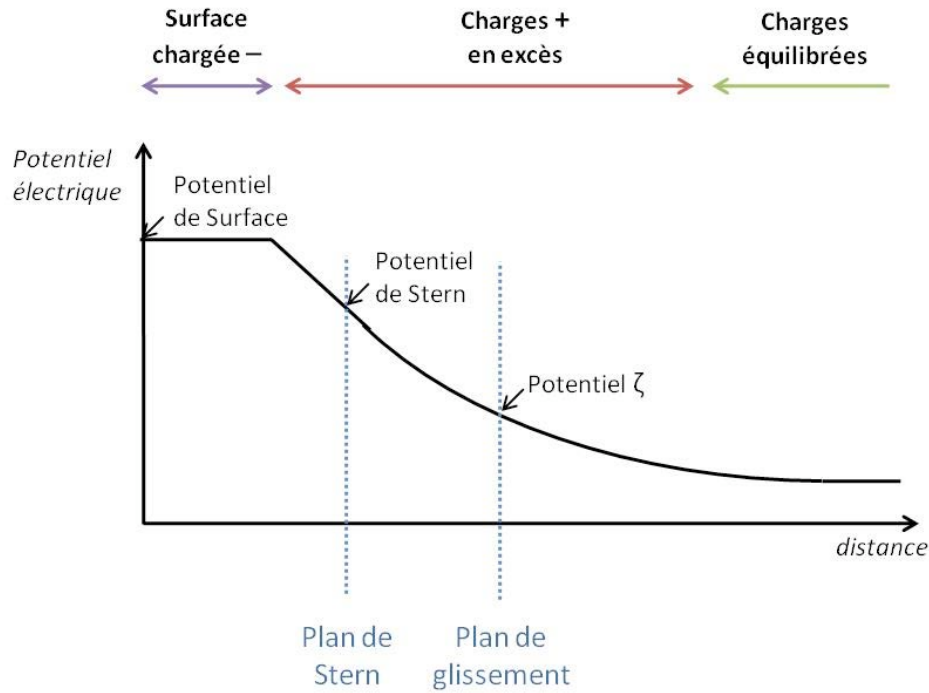


Figure 8. Représentation schématisée du potentiel électrique et de la distribution des charges en fonction de la distance à la surface d'un composé dispersé (d'après Lyklema, 2005).

Mesure de la mobilité électrophorétique

Afin de déterminer le potentiel ζ , il est nécessaire de réaliser des mesures expérimentales de mobilité des particules en solution dans un champ électrique. Si ces particules présentent une charge électrique à leur surface, elles vont se déplacer vers l'électrode présentant une charge opposée. Le déplacement des particules est alors mesuré à l'aide d'un rayonnement laser par effet Doppler. Le potentiel ζ peut être calculé à partir des valeurs de mobilité électrophorétique à l'aide de l'équation établie par Marian Smoluchowski en 1903 :

$$\mu_e = (\epsilon_r \cdot \epsilon_0 \cdot \zeta) / \eta \quad (\text{Équation 4})$$

où μ_e est la mobilité électrophorétique, ϵ_r est la constante diélectrique du milieu, ϵ_0 la permittivité du vide et η la viscosité dynamique.

Bien que cette équation permette de calculer le potentiel ζ de particules de toute taille et à toute concentration, elle présente deux limites importantes. La première vient du fait que l'épaisseur de la double couche électrique n'est pas prise en compte dans l'équation et cette

dernière n'est valable que pour les cas où cette épaisseur est très inférieure au rayon de la particule. La seconde limite de l'équation de Smoluchowski est due à l'absence de prise en compte de la conductivité de surface de la particule.

Théorie des particules molles

De nombreuses études ont déterminé le potentiel ζ de bactéries en faisant appel à l'équation de Smoluchowski (Ouhara *et al.*, 2005 ; Habash *et al.*, 1997 ; van der Mei *et al.*, 1988). Bien que cette approche ait permis une meilleure compréhension des propriétés de surfaces bactériennes et leur implication dans de nombreux phénomènes, elle présente des limitations majeures. En effet, le recours à l'équation de Smoluchowski contraint à considérer les bactéries comme des particules dures, sphériques et homogènes.

De nouveaux outils théoriques ont été développés prenant en compte le caractère perméable (Rodríguez *et al.*, 2002 ; Ohshima et Kondo, 1993) et hétérogène des surfaces bactériennes (Duval et Ohshima, 2006 ; Duval *et al.*, 2004).

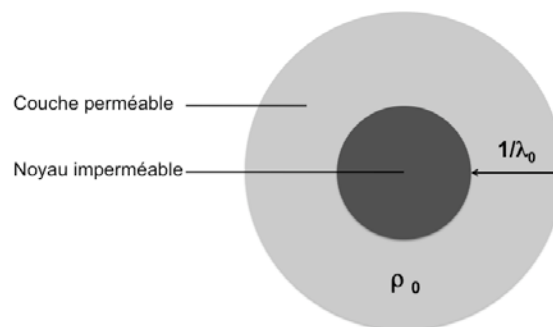


Figure 9. Représentation schématique d'une particule molle. $1/\lambda_0$: épaisseur de la couche perméable, ρ_0 : densité de charge au sein de la couche perméable (d'après Duval et Gaboriaud, 2010).

Les bactéries sont alors considérées comme des particules dites molles (Figure 9), c'est-à-dire constituées d'un noyau imperméable entouré d'une couche polymérique chargée au sein de laquelle des ions peuvent diffuser (Duval et Gaboriaud, 2010). Cette couche est alors composée de la paroi cellulaire ainsi que des différentes structures pouvant exister à sa surface (lipopolysaccharides, *pili*, *fimbriae*).

L'équation de Ohshima décrit donc la mobilité électrophorétique comme il suit :

$$(Équation 5) \quad \mu = \frac{\rho_o}{\eta \lambda_o^2} + \frac{\varepsilon \psi^o / \kappa_m + \psi^D / \lambda_o}{\eta (1 / \kappa_m + 1 / \lambda_o)}$$

où μ est la mobilité électrophorétique, ρ_o la densité de charge au niveau de la couche perméable, κ_m est l'inverse de l'épaisseur de Debye, ε la permittivité diélectrique du milieu, η la viscosité dynamique, λ_o l'épaisseur de la couche perméable, ψ^o le potentiel à la limite de la couche perméable et ψ^D le potentiel de Donnan.

Selon cette équation, confirmée expérimentalement, la mobilité de bactéries en fonction de la force ionique atteint un plateau de valeur non nulle pour les fortes concentrations ioniques où $\mu = \frac{\rho_o}{\eta \lambda_o}$, contrairement à ce qui est prédit et observé pour des particules dites dures (Figure 10).

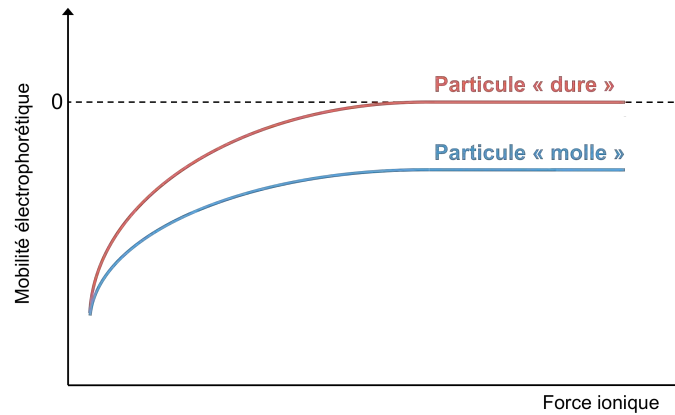


Figure 10. Profils types de mobilité électrophorétique de particules dites « dures » et « molles ».

L'équation de Ohshima, bien que permettant d'aborder plus justement les phénomènes de mobilité électrophorétique que l'équation de Smoluchowski, présente toutefois des limitations. Celles-ci concernant la force ionique du milieu, la forme de la bactérie, la présence de structures à la surface de la bactérie et l'homogénéité de la distribution des charges électriques au sein de la couche perméable. Un important développement théorique a donc été réalisé par Duval et Ohshima (2006) afin de prendre en compte ces paramètres qui

jouent un rôle majeur dans le cas de l'étude de bactéries. Ainsi, le lien entre la pathogénie, les propriétés électro-hydrodynamiques et la présence de l'épitope Mab3/1 a été étudié chez *Legionella pneumophila* sg1 (Gosselin *et al.*, 2011). De même, la relation entre la force ionique et la protonation de surface ont été étudié chez *Bacillus licheniformis* S-86 (Castro *et al.*, 2010).

Les formalismes concernant la mobilité électrophorétique de particules molles continuent à être développés et affinés afin de prendre en compte d'autres propriétés telles que l'effet de solidification (Ohshima, 2010a) ou de relaxation (Ohshima, 2010b). Parmi ces affinements, ceux réalisés par Duval *et al.* (2011) permettent de prendre en compte l'hétérogénéité de la couche perméable aux ions, en la considérant comme une succession de couches d'épaisseurs et de densités différentes présentant des dissociations des groupements ionogènes distincts.

III.2. A l'échelle de la cellule bactérienne : la microscopie de force atomique

La microscopie de force atomique (A.F.M.), inventée par Binnig *et al.* (1986), est un outil permettant d'obtenir d'une part la topologie d'échantillons biologiques et d'autre part leurs propriétés mécaniques. La A.F.M. présente une grande sensibilité au niveau des mesures de force (en dessous du nano-Newton), une haute résolution spatiale (en dessous du micromètre) et la possibilité de travailler en temps réel dans des conditions physiologiques pour les échantillons bactériens.

Schématiquement, un microscope de force atomique est composé de trois composants majeurs : une pointe, un scanner piézo-électrique et un système de déflexion optique composé d'un laser et d'un détecteur (Figure 11).

La pointe utilisée joue un rôle majeur au sein de l' A.F.M. et est localisée à l'extrémité d'un levier en silicone flexible et de forme rectangulaire ou en « V » (Figure 12). La pointe va alors balayer l'échantillon étudié et le levier va se déplacer selon la topologie de l'échantillon (Braga et Ricci, 1998). Un rayonnement laser est envoyé sur le levier et le déplacement de sa déflexion est enregistré à l'aide d'un système optique et d'un photodétecteur.

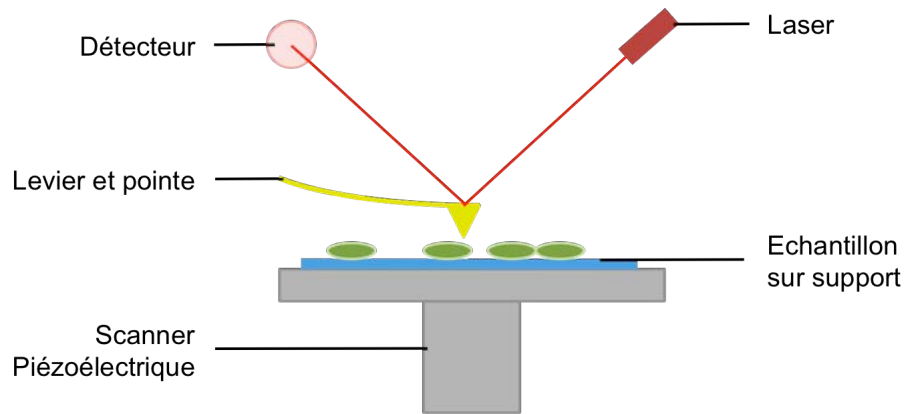


Figure 11. Représentation schématique d'un microscope de force atomique (adapté d'après Liu et Wang, 2010).

Ce type de système permet une mesure de déplacement vertical de déflexion de 0,01 nm au niveau de l'échantillon (Bustamante et Keller, 1995) avec comme limitation la vibration thermique du levier (Bustamante et Keller, 1995). La résolution latérale dépend de la forme de la pointe et notamment de son extrémité. Les géométries rencontrées habituellement sont pyramidales, tétraédriques ou encore coniques avec un rayon de courbure compris entre 10 et 50 nm (Yokota *et al.*, 1998). Les constantes d'élasticité des leviers sont comprises quant à elle entre 0,01 et 100 N/m (Bonnell, 2000).

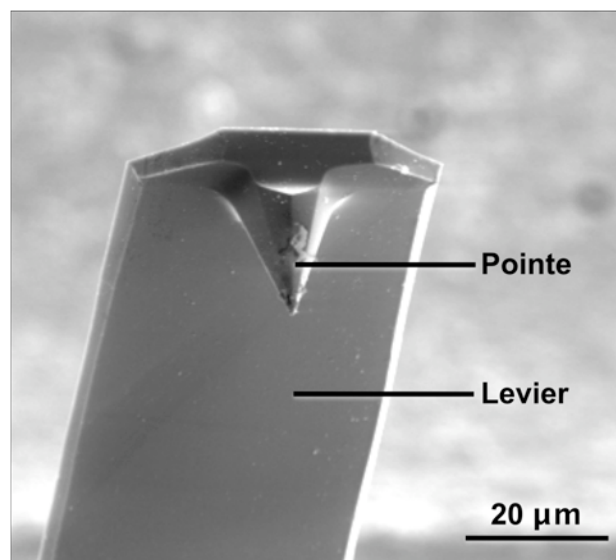


Figure 12. Photographie d'un levier et d'une pointe utilisée en microscopie de force atomique (image NanoScience Instruments).

Concernant les limites des mesures de force, celles-ci résultent à la fois de la vibration thermique du levier et du bruit d'origines électrique et optique (Takano *et al.*, 1999). D'un

point de vue pratique, il est extrêmement important de calibrer les leviers utilisés du fait de la variabilité de leurs constantes d'élasticité (Cleveland *et al.*, 1993) et pour cela, différents procédés ont été mis au point (Burnham *et al.*, 2003 ; Sader *et al.*, 1995 ; Cleveland *et al.*, 1993 ; Hutter et Bechhoefer, 1993).

Afin d'obtenir la topologie d'un échantillon par A.F.M., il existe deux modes d'obtention d'image : un mode dit « contact » et un mode dit « dynamique » (Liu et Wang, 2011 ; Liu et Wang, 2010). Avec le premier mode, la pointe demeure au contact et balaie la surface de l'échantillon. Bien que ce mode permette d'obtenir des images à haute résolution, le contact direct entre la pointe et l'échantillon crée une force latérale qui peut entraîner une déformation des échantillons les plus mous. En mode « contact », deux images sont obtenues : une image de déflexion et une image de hauteur. L'image de hauteur, obtenue en enregistrant la déflexion du levier quand la pointe balaie la surface de l'échantillon, permet d'obtenir la topographie de l'échantillon et par conséquent de mesurer précisément la rugosité de surface, la hauteur des différentes structures ainsi que l'épaisseur des différentes couches de l'échantillon (Dufrêne, 2002). L'image de déflexion quant à elle est générée en ajustant la hauteur de l'échantillon, *via* une boucle de rétro-contrôle, afin de garder la déflexion du levier constante lors du balayage de l'échantillon par la pointe. Cette image ne reflète pas les variations réelles de hauteur de l'échantillon mais permet de révéler des détails de surface beaucoup plus fins (van der Aa *et al.*, 2002). Les paramètres utilisés pour obtenir une image topographique d'un échantillon sont la localisation de la sonde (ses coordonnées en x et y) et la hauteur de la sonde à ce point, c'est à dire sa valeur de z aux coordonnées x et y. La précision de la localisation de la pointe dans le plan et en hauteur est donc essentielle et doit donc être assurée par un système piezzo-électrique très sensible.

Avec le mode « dynamique », la pointe est en contact intermittent avec l'échantillon et le levier oscille à sa fréquence de résonance lors du balayage de l'échantillon (Martin *et al.*, 1987 ; Zhong *et al.*, 1993) avec une amplitude d'oscillation comprise entre 100 et 200 nm. Ce mode permet donc de réduire significativement la force latérale entre la pointe et l'échantillon. Il existe également une autre approche au sein du mode « dynamique » où la pointe n'est jamais au contact de l'échantillon. Le levier vibre alors à une fréquence légèrement supérieure à sa fréquence de résonance avec une amplitude de plusieurs nanomètres. Les mouvements de la pointe, bien que celle-ci n'entre jamais en contact avec l'échantillon, sont alors influencés par les forces de van der Waals et d'interactions à longue

distance et permettent d'obtenir ainsi des informations topologiques sur l'échantillon.

Les études topologiques par A.F.M. ont permis la mise en évidence d'altérations morphologiques suite à des traitements par des composés à activité antibactérienne. Ainsi, la longueur, le diamètre et la rugosité de surface de différentes souches sont modifiées par un traitement au carvacrol (La Stora *et al.*, 2011). De même, il a été montré que BP100 et PepR, deux peptides antimicrobiens, causent des dommages conséquents au niveau de la paroi d'*E. coli* avec la déformation des bactéries ainsi que la présence de nombreuses protrusions à leur surface (Alves *et al.*, 2010).

Les propriétés physiques ainsi que les forces d'interactions peuvent être également mesurées par A.F.M.. Pour cette utilisation, la pointe approche, entre au contact et se retire de l'échantillon et la déflexion du levier est enregistrée en fonction de son déplacement vertical. Une courbe de force en fonction de la distance est ainsi réalisée et peut être obtenue à de nombreuses localisations d'un échantillon. Ainsi, généralement, la surface d'un échantillon est « découpée » en pixels et, pour chacun d'entre eux, une mesure est réalisée et une courbe de force en fonction de la distance est obtenue. Une telle courbe peut alors être exploitée pour déterminer des propriétés telles que l'élasticité de la paroi bactérienne (Weisenhorn *et al.*, 1989), la pression de turgescence, l'adhésion (Hoh *et al.*, 2011) ou encore, en cas d'utilisation de pointes appropriées, l'hydrophobicité et l'état de charge de la surface bactérienne. Lorsque la distance entre l'échantillon et la pointe est grande, la force appliquée à cette dernière est nulle. Lorsqu'il approche de la surface de l'échantillon, le levier va se déformer en raison des forces de répulsion jusqu'à son entrée en contact qui a lieu quand les forces attractives dépassent la constante d'élasticité du levier ajoutée aux forces répulsives (Dufrêne, 2002). La courbe d'approche peut être utilisée pour mesurer les forces de surface telles que les forces de van der Waals, les forces électrostatiques et les forces hydrophobes. Si la force mesurée lors du contact augmente, le profil de cette courbe peut alors fournir une information sur l'élasticité de l'échantillon. Lorsque la pointe est éloignée de l'échantillon, la distance à laquelle l'élasticité dépasse les interactions adhésives est un paramètre important pour l'étude de l'adhésion des surfaces bactériennes.

L'utilisation de l'A.F.M. dans l'étude des propriétés nanomécaniques bactériennes a ainsi permis de montrer que l'élasticité et la pression de turgescence d'*Escherichia coli* K-12 ne dépendent pas uniquement de la force osmotique du milieu mais également de la présence et de la nature de structures extracellulaires telles que les *pili* ou les *fimbriae* (Francius *et al.*, 2011). L'étude *in situ* des propriétés d'adhésion de différents L.P.S. de mutants de

Pseudomonas aeruginosa a également été réalisée par A.F.M. (Ivanov *et al.*, 2011) montrant ainsi que la longueur des LPS n'était pas corrélée aux propriétés d'adhésion de la souche alors que ces propriétés d'adhésion sont corrélées à la pathogénie (Ivanov *et al.*, 2011).

De récents développements ont conduit à la fonctionnalisation des pointes par greffage de groupements chimiques déterminés sur ces dernières (Müller *et al.*, 2009). Il est alors possible d'analyser par exemple l'hydrophobicité locale de cellules isolées et d'aller plus loin dans la compréhension des propriétés de surface des bactéries et de l'ensemble des processus physiologiques qui y sont liés (Noy, 2006 ; Frisbie *et al.*, 1994). Une variante de ces approches consiste à fixer des bactéries sur la pointe et mesurer les forces entre celles-ci et différents substrats (Muller *et al.*, 2009 ; Helenius *et al.*, 2008 ; Dufrêne et Hinterdorfer, 2008). La sensibilité de ces méthodes permet la détection de force allant de 5 piconewtons, pour la liaison entre un récepteur et son ligand, à plus de 100 nanonewtons pour l'adhésion de cellules entières (Muller *et al.*, 2009).

Résultats

Chapitre II : Résultats

Les sujets de recherche ayant trait aux bactériocines au sens large sont abondamment développés et ce, depuis plusieurs décennies. Ainsi, l'entrée "bacteriocin" dans la banque de données bibliographiques "PubMed" renvoie à plus de 6500 références datant de 1946 pour la plus ancienne (Salle et Jann, 1946). L'ensemble de ces travaux traitent des bactériocines tant au niveau de leurs applications en conservation alimentaires, que des mécanismes de sensibilité/résistance ou encore de leur récepteur. Nos travaux se sont orientés vers l'étude des mécanismes d'action. Compte-tenu du contexte scientifique, il était judicieux de faire appel à des approches nouvelles et innovantes pour aborder la compréhension des mécanismes d'action des bactériocines de classe IIa. De ce fait, une grande partie de ces travaux a fait appel à des méthodologies empruntées au domaine de la biophysique n'ayant pas encore été mises au service de cette thématique, telles que les mesures de mobilité électrophorétique des particules molles et la microscopie de force atomique. Ces approches ont eût pour objectifs de caractériser les surfaces de différentes souches bactériennes en vue, d'une part, d'étudier le lien entre ces propriétés et les phénomènes de sensibilité/résistance à Cbn BM1 et, d'autre part, de définir les modèles bactériens pour la suite des travaux. Il en effet primordial de maîtriser les différents mécanismes ayant trait aux phénomènes de résistance aux bactériocines de classe IIa afin de limiter autant que possible l'émergence de résistants liés à des applications non maîtrisées de ces composés. Une fois les modèles bactériens retenus, c'est-à-dire *C. maltaromaticum* DSM20730, *L. monocytogenes* EGDE et *L. monocytogenes* EGDE Δ *mptI*, les mécanismes d'action de Cbn BM1 vis-à-vis de ces souches ont été étudiés. Une approche préliminaire par microscopie de force atomique de l'impact de Cbn BM1 sur les propriétés nano-mécaniques de *C. maltaromaticum* DSM20730 a également été entreprise.

I. Obtention et caractérisation de la carnobactériocine Cbn BM1

Avoir une quantité suffisante de bactériocines purifiées est un prérequis indispensable à toute étude visant la caractérisation des mécanismes d'action de ces peptides. La première approche face à cette nécessité est de purifier les bactériocines à partir de la production des souches naturellement productrices (Jack *et al.*, 1996 ; Guyonnet *et al.*, 2000). Ainsi, la

piscicocine CS526 produite par *Carnobacterium piscicola* (Yamazaki *et al.*, 2005) et la divergicine M35 produite par *Carnobacterium divergens* (Tahiri *et al.*, 2004) ont été purifiées. La limite majeure de ce type d'approche est la très faible quantité de peptide produite avec l'obtention d'environ 100 µg par litre de surnageant de culture. D'autres méthodes ont été développées telles que l'adsorption aux membranes (Yang *et al.*, 1992) ou la partition de phase (Métivier *et al.*, 2000). Là aussi, les quantités obtenues s'avèrent très faibles. Afin de pallier au problème de quantité de bactériocine produite, des stratégies d'expression hétérologue chez *Escherichia coli* ont été entreprises et ont permis la production de la divercine et de la piscicoline (Richard *et al.*, 2004 ; Gibbs *et al.*, 2004) à hauteur de 20 mg.L⁻¹. L'expression hétérologue a également permis l'obtention des bactériocines Cbn BM1 et Cbn B2 produites par *Carnobacterium maltaromaticum* CP5, par Jasniewski *et al.* (2008) (Tableau 7).

Une autre voie pour l'obtention de bactériocine pure est la synthèse chimique comme cela a été réalisé pour la mésentérocine 52A (Jasniewski *et al.*, 2008a,b). Les deux limites majeures de cette approche sont d'une part le faible rendement de synthèse pour les longs peptides et, d'autre part, le coût relativement élevé.

L'initiation des travaux de thèse présentés au sein de ce manuscrit s'est inscrite dans la continuité des travaux de Jasniewski *et al.* et ont débuté par la production et la purification de Cbn BM1 et Cbn B2.

Tableau 7. Séquences protéiques et masses moléculaires des carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2.

Bactériocine	Séquence	Nombre d'acides aminés	Masse moléculaire (Da)
Cbn BM1	AISYGNGVYCNKEKCWNKAENKQAITGIVIGGWASSLAGMGH	43	4534
Cbn B2	VNYGNGVSCSKTKCSVNWGQAFQERYTAGINSFVSGVASGAGSIGRRP	48	4966

I.1. Matériel et méthodes

I.1.1. Production par expression hétérologue chez *Escherichia coli*

L'ensemble du matériel et des méthodes employées pour l'expression hétérologue et la purification par H.P.L.C. de Cbn BM1 et Cbn B2 ayant fait l'objet d'une publication

(Jasniewski *et al.*, 2008), une description succincte des différentes étapes sera faite au sein de la présentation des résultats relatifs à cette partie.

1.1.2. Synthèse des peptides par voie chimique

La synthèse chimique, l'analyse de pureté (par H.P.L.C. à phase inverse) et de masse (par électrobulisisation) de Cbn BM1 ont été réalisées par la société Genepep (Genepep, Montpellier, France).

1.1.3. Dichroïsme circulaire

Les spectres de dichroïsme circulaire de Cbn BM1 ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Jobin-Yvon CD6 utilisant un logiciel dédié. Les mesures ont été enregistrées à 25 ° C à l'aide d'une cuvette de quartz présentant un trajet optique de 1 mm de parcours. Les spectres ont été scannés avec un pas de 0,2 nm, un temps de réponse de 1s, une bande passante de 2 nm de 190 à 250 nm, et moyennés sur 3 scans. Les solutions de Cbn BM1 ont été préparées en dissolvant le peptide pour obtenir une concentration de 24 μ M soit dans un tampon phosphate (5 mM, pH = 6,5) soit dans des solutions de 2,2,2-trifluoroéthanol (TFE) (de 25:75 à 75:25 (vol / vol) TFE-tampon phosphate). Le pourcentage d'hélice α a été calculé en utilisant le logiciel de déconvolution de spectre Dichroprot (Deléage et Geourjon, 1993).

I.2. Résultats

1.2.1. Expression hétérologue chez *E. coli*

La première étape de cette méthode est l'expression des formes matures des bactériocines fusionnées à la thiorédoxine (Cbn BM1-Trx et Cbn B2-Trx) (Figure 13).

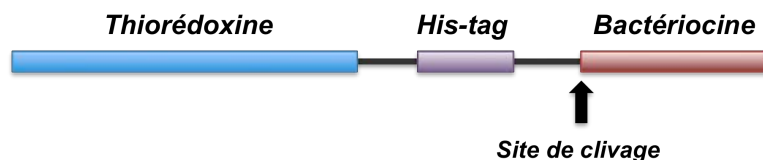


Figure 13. Représentation schématique des protéines de fusion obtenues par expression hétérologue chez *Escherichia coli*. Le site de clivage correspond à la séquence reconnue par l'entérokinase pour Cbn BM1 ou à une méthionine pour Cbn B2.

Cette fusion permet d'éviter la formation de corps d'inclusion et d'inactiver l'activité antibactérienne afin d'éviter toute toxicité au sein d'*Escherichia coli*. La construction génétique est réalisée au sein du plasmide pET32a conférant une résistance à la carbenicilline et permettant l'induction de la production par le lactose. La souche retenue pour la production est *Escherichia coli* BL21(DE3) qui exprime une lactose perméase et qui ne présente aucune résistance aux antibiotiques avant transformation, ce qui permet lors de la culture en réacteur de n'utiliser que la carbenicilline. Cette limitation dans l'utilisation d'antibiotique pour maintenir la pression de sélection permet d'éviter d'éventuels problèmes de croissance ou de production. Après transformation de la souche dédiée à la production, plusieurs dizaines de transformants sont obtenus. Parmi ceux-ci, plusieurs sont testés pour leurs capacités à exprimer la protéine d'intérêt. Après cette sélection, les cultures sont menées en réacteur de type "fed-batch" en milieu "terrific broth" où l'induction est réalisée à l'aide d'un apport continu en lactose (500 g.L^{-1} , 15 mL.h^{-1}) et en carbenicilline (250 mg.L^{-1} , 15 mL.h^{-1}). L'extrait protéique total d'*E. coli* pET32aBM1-Trx obtenu après lyse des cellules cultivées sans lactose ou après 4h30 ou 22h d'induction au lactose (Figure 14). Une bande de forte intensité correspondant à Cbn BM1-Trx (22,5 kDa) est visible pour l'extrait correspondant à une durée d'induction de 22h. La même approche expérimentale a été appliquée pour l'expression hétérologue de Cbn B2-Trx et a également permis d'obtenir une forte expression de la protéine de fusion.

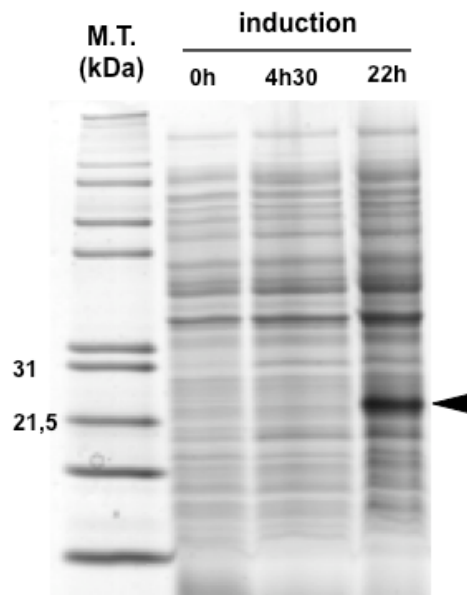


Figure 14. Exemple d'électrophorégramme SDS-PAGE de l'extrait protéique total d'*Escherichia coli* pET32a BM1-Trx. Différentes durées d'induction de la production de Cbn BM1-Trx par le lactose sont présentées (0h, 4h30 et 22h). M.T. : marqueur de taille. ◀ : Cbn BM1-Trx.

I.2.2. Expression hétérologue et purification de Cbn BM1 et Cbn B2

Une fois l'expression hétérologue des deux protéines de fusion réalisée, les bactéries sont récoltées et lysées par presse de French à 1,8 kbar. Une première purification est alors réalisée par chauffage (80 °C pendant 20 minutes) de l'extrait protéique brut afin de coaguler thermiquement différentes protéines (Figure 15). La coagulation thermique a permis l'élimination de nombreuses protéines de haut poids moléculaire sans perte majeure de la protéine d'intérêt. Suite à cette étape, l'extrait protéique est de nouveau partiellement purifié à l'aide d'une approche chromatographique de type I.M.A.C. (pour "*Immobilized Metal Affinity Chromatography*"). Ainsi, la protéine de fusion va s'adsorber sur la matrice par affinité pour les ions Ni^{2+} . Cette affinité est due à la présence d'un motif "His-tag" entre la bactériocine et la thiorédoxine au sein de la construction. Le protéine de fusion sera alors purifiée grâce à une élution en solutions d'imidazole (0-200 mM).

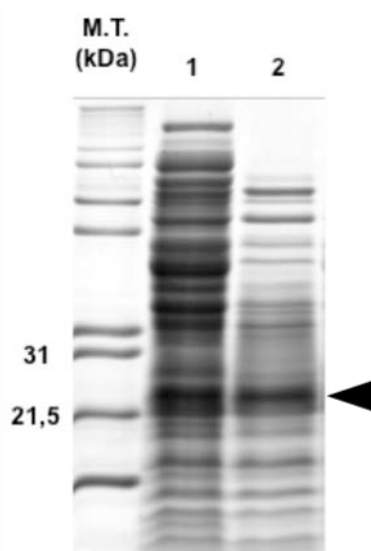


Figure 15. Exemple d'électrophorégramme SDS-PAGE de l'extrait protéique totale d'*Escherichia coli* pET32a BM1-Trx avant (1) et après (2) coagulation thermique. M.T. : marqueur de taille. ◀ : Cbn BM1-Trx.

Afin d'obtenir les peptides sous leur forme mature, une coupure de la protéine de fusion est alors nécessaire. Pour Cbn B2-Trx, celle-ci est réalisée chimiquement au niveau des résidus méthionine à l'aide d'une solution d'acide formique et de cyanure. La bactériocine Cbn BM1 comporte un résidu méthionine au sein de sa séquence primaire. Par conséquent, une approche de coupure chimique de Cbn BM1-Trx n'est pas envisageable. Cette dernière est réalisée par voie enzymatique à l'aide de l'entérokinase au niveau d'un site spécifique placé en amont de Cbn BM1 lors de la construction du vecteur d'expression.

Pour Cbn BM1, la présence d'une activité antibactérienne vis-à-vis une souche indicatrice (*C. maltaromaticum* DSM20730) a été vérifiée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé. Pour Cbn B2, ce contrôle est impossible car le peptide est alors solubilisé dans une solution d'acide formique-CNBr, elle-même bactéricide.

Une fois les protéines de fusion clivées, une ultime étape de purification est réalisée par chromatographie liquide à haute pression (H.P.L.C. pour "*High Pressure Liquid Chromatography*"). La matrice utilisée est de type C18 et les phases mobiles sont, d'une part, une solution de H₂O-T.F.A. (0,1 %) (solution A) et, d'autre part, une solution d'acétonitrile-T.F.A. (0,1 %) (solution B) (Tableau 8).

Tableau 8. Gradient de solvant utilisé pour la purification de Cbn BM1 et Cbn B2.

Durée (min)	Solution A	Solution B
10	100	0
20	70	30
10	70 -> 0	30 -> 100
25	0	100
15	100	0

Les différentes fractions de purifications sont récoltées par intervalle d'une minute afin de tester la présence de l'activité antibactérienne. Cette étape a tout d'abord été réalisée à l'échelle analytique. Celle-ci autorise l'injection, et donc la purification, d'un volume de 50 µL de solution de protéine de fusion clivée toutes les 80 minutes. L'analyse par des essais de diffusion en milieu gélosé montre qu'une activité antibactérienne est présente après purification à l'échelle analytique (Figure 16). Le puits 6, correspondant à un dépôt de 25 µL de la fraction éluée à 50 minutes, présente une activité contre *C. maltaromaticum* DSM20730.

Compte tenu de la quantité de bactériocine nécessaire pour les expérimentations ultérieures, il est alors apparu nécessaire de réaliser une purification à l'échelle semi-préparative. En effet, il est possible à cette échelle de travail de purifier un volume cent fois supérieur à celui utilisé à l'échelle analytique et ce, dans un même laps de temps.



Figure 16. Exemple de test d'activité antibactérienne de fractions de purification par H.P.L.C. à l'échelle analytique de Cbn BM1 par la méthode de diffusion sur milieu gélosé. La souche indicatrice utilisée est *Carnobacterium maltaromaticum* DSM20730 et le volume de solution déposé est de 25 μ L.

Lors des purifications réalisées à l'échelle semi-préparative, malgré l'observation de pics d'absorption de l'U.V. à 280 nm à environ 50 minutes pour Cbn BM1, aucune activité bactérienne n'a pu être détectée et ce, que ce soit par des essais de diffusion en milieu gélosé ou par des essais d'inhibition de croissance en milieu liquide.

Que ce soit à l'échelle analytique ou semi-préparative, la présence de deux pics d'absorption chevauchant est toujours observée pour Cbn BM1 (Figure 17). A l'échelle analytique, une activité antibactérienne est observable pour les fractions correspondant aux deux pics. Il s'agirait donc de deux formes de Cbn BM1, toutes deux actives. L'hypothèse peut alors être faite qu'une partie des peptides aient subi spontanément une oxydation et ce, probablement au niveau du résidu méthionine 41. Celle-ci ne modifierait alors pas l'activité de Cbn BM1. L'étape de purification par H.P.L.C. entraînant une dilution de la solution injectée, il était donc possible que l'absence d'activité détectable soit due à une concentration trop faible en bactériocine dans les fractions issues de l'étape de H.P.L.C. semi-préparative. Les différentes fractions récoltées ont alors été lyophilisées en vue de resuspendre les peptides éventuellement présents dans un volume moindre de tampon phosphate. Cette étape a pour but premier de concentrer les fractions mais elle permet également d'obtenir les bactériocines dans une solution compatible avec les essais ultérieurs. En effet, la présence d'acétonitrile ou de TFA pourrait conduire à l'éventuelle observation d'activités artefactuelles car ces deux composés sont susceptibles d'interférer soit sur la bactériocine en elle-même soit sur les bactéries et leurs membranes. En dépit de cette étape de concentration des fractions de purification, aucune activité antibactérienne n'a pu être détectée pour Cbn BM1 et Cbn B2

malgré la présence de celle-ci, du moins pour Cbn BM1, avant l'étape d'H.P.L.C. et après celle-ci à l'échelle analytique.

L'expression hétérologue de Cbn BM1 et Cbn B2 suivie de leur purification à l'échelle semi-préparative a été tentée à plusieurs reprises mais aucune activité n'a jamais été obtenue suite à l'étape d'H.P.L.C. à l'échelle semi-préparative.

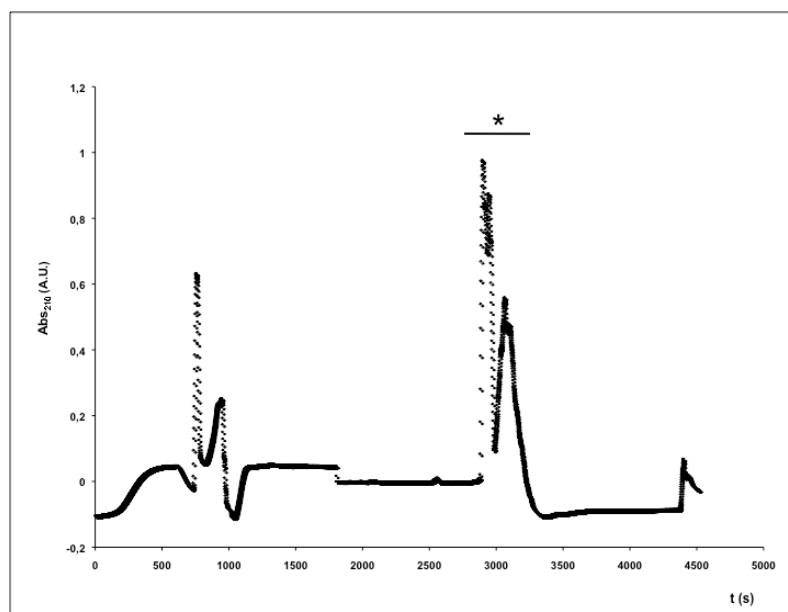


Figure 17. Spectre d'absorption U.V. de l'étape de purification par H.P.L.C. de Cbn BM1 à l'échelle semi-préparative. La zone marquée d'une astérisque correspond aux fractions où une activité antibactérienne est observable.

1.2.3. Obtention par synthèse chimique et caractérisation de Cbn BM1

Face à l'impossibilité de purifier les bactériocines en quantité suffisante, le choix a alors été fait de faire appel à la synthèse chimique des peptides. Des difficultés inhérentes au nombre d'acides aminés constitutifs des deux bactériocines ont été rencontrées. En effet, si ce type de synthèse ne pose pas de problème pour des peptides composés d'une vingtaine d'acides aminés ou moins, la synthèse est plus délicate pour des peptides plus longs. De ce fait, il s'est avéré impossible de synthétiser Cbn B2 par voie chimique du fait que ce peptide est composé de quarante huit acides aminés. Il a cependant été possible d'obtenir Cbn BM1 en quantité suffisante et avec un haut niveau de pureté (> 95%) par cette voie (Figure 18). Ce dernier critère est primordial car les impuretés de synthèse sont des peptides tronqués et

pourraient conduire à l'observation de phénomènes artefactuels lors des études de mécanisme d'action.

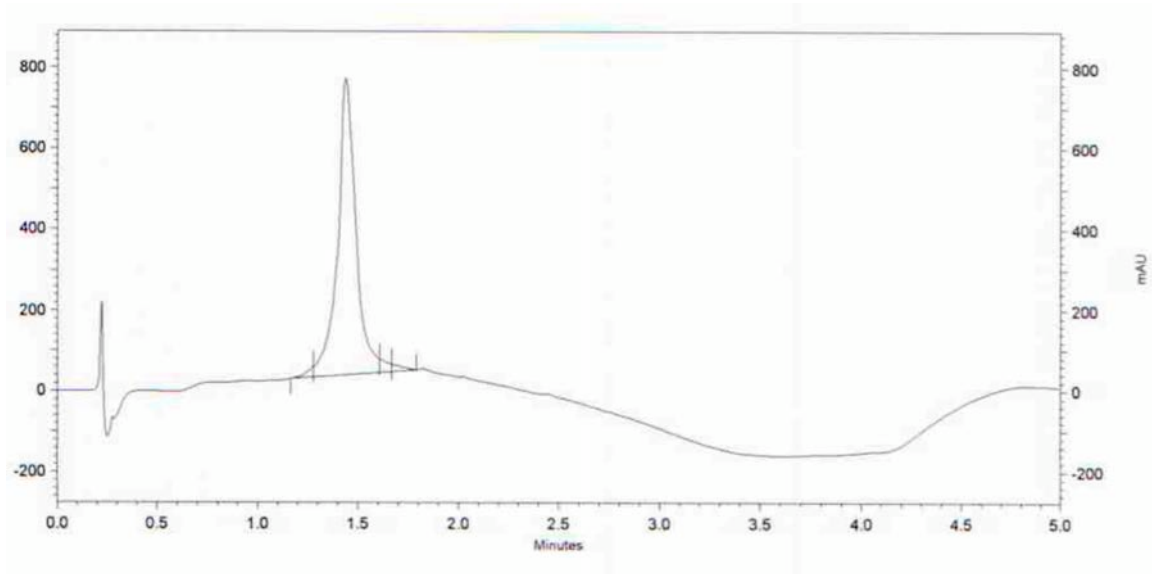


Figure 18. Chromatogramme de l'analyse de pureté de Cbn BM1 obtenu par synthèse chimique. L'aire sous le pic (temps de rétention de 1,44 minute) correspond à 95,7 % de la totalité des aires sous pic de ce spectre.

Une fois le peptide obtenu, une analyse en spectrométrie de masse a été réalisée. La masse déterminée est de 4540 Da, soit 16 Da de plus que celle attendue (Figure 19). Ceci correspond donc à la présence d'un atome d'oxygène supplémentaire, c'est à dire une oxydation, et il est probable que celle-ci ait lieu au niveau du résidu méthionine 41, seul site d'oxydation possible.

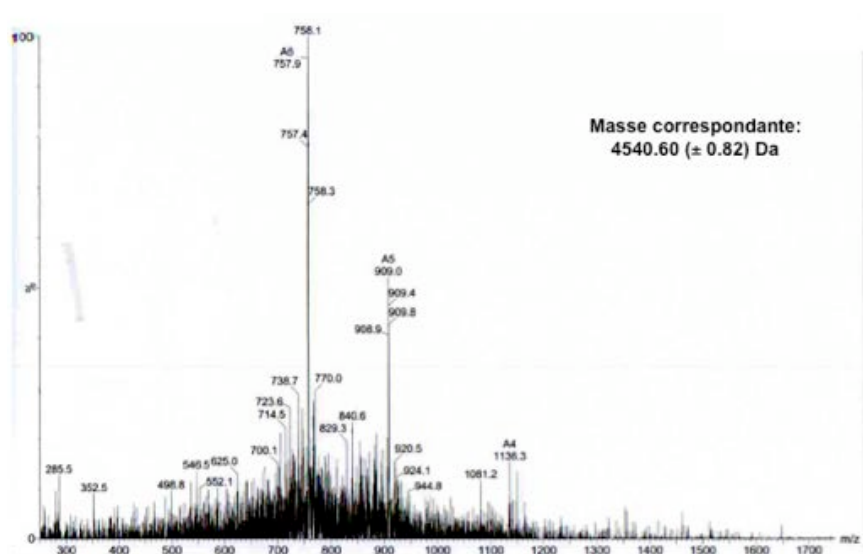


Figure 19. Spectre d'analyse de masse de Cbn BM1 synthétisé par voie chimique.

Le peptide Cbn BM1 obtenu par synthèse est donc sous forme oxydée et l'analyse de pureté montre que la totalité de la quantité de peptide est sous cette forme. L'obtention d'une forme spontanément oxydée laisse supposer que Cbn BM1 est très sensible à ce phénomène. Ceci expliquerait donc la présence systématique de deux pics lors de la purification par H.P.L.C. (Figure 17) qui correspondrait à l'existence concomitante d'une forme oxydée et d'une forme réduite du peptide obtenu par expression hétérologue. Ceci soulève par conséquent la question de l'état "naturel" de Cbn BM1 lors de sa production par *C. maltaromaticum* CP5. Il est en effet envisageable que la forme oxydée soit la forme produite, et biologiquement active, de Cbn BM1.

Avant d'aller plus loin dans l'étude des mécanismes d'action de Cbn BM1, il est nécessaire de s'assurer que l'oxydation de la méthionine 41 ne soit délétère ni pour la structuration du peptide, ni pour son activité antibactérienne. Différents travaux ont montré que les bactériocines de classe IIa adoptent une structure en hélice α en présence de membranes lipidiques ou de solutions mimant ces dernières (solutions de trifluoroéthanol ou T.F.E.) (Wang *et al.*, 1999). Une détermination du taux d'hélice α de Cbn BM1 solubilisée dans des solutions de différentes concentrations en T.F.E. a alors été réalisée par dichroïsme circulaire (Tableau 9).

Tableau 9. Hélicité de Cbn BM1 en solutions mimant les membranes plasmiques déterminée par dichroïsme circulaire. T.F.E.: trifluoroéthanol.

T.F.E. / tampon phosphate (v/v)	Taux d'hélice d'hélice α
0/1	5.2%
25/75	13.6%
50/50	19.2%
75/25	19.9%

Malgré l'oxydation de Cbn BM1, des mesures de dichroïsme circulaire montrent que le peptide se structure en hélice α lorsqu'il est placé en condition mimant les membranes.

Parallèlement à cette structuration, les tests d'activité réalisés par la méthode de diffusion sur milieu gélosé sur différentes souches du spectre de Cbn BM1 (Jasniewski *et al.*, 2009) ont confirmé son activité antibactérienne. L'étude détaillée de cette activité antibactérienne sera présentée dans les chapitres suivants. La présence d'une méthionine oxydée en 41ème position de la structure primaire de Cbn BM1 n'entraîne pas de perturbation

de son activité. La structuration en hélice α en milieu polaire est un paramètre essentiel et a été décrite comme directement liée à l'activité des bactériocines de classe IIa (Ennahar *et al.*, 2000). D'autres modifications, notamment au niveau du motif YGNGV, peuvent conduire à une diminution voire une perte d'activité (Miller *et al.*, 1998 ; Quadri *et al.*, 1997) mais pas nécessairement (Suzuki *et al.*, 2005 ; Tomita *et al.*, 1996 ; Kanatani *et al.*, 1995). De même, la présence d'un pont di-sulfure peut, selon la bactériocine concernée, s'avérer indispensable (Bhugaloo-Vial *et al.*, 1999 ; Hastings *et al.*, 1991) ou non (Simon *et al.*, 2002) ; (Hastings *et al.*, 1991). Il est à noter que dans le cas de la divercine RV41, des modifications dans la région C-terminale conduisent à une altération de son activité antibactérienne bien que la structuration tridimensionnelle ne soit pas affectée (Rihakova *et al.*, 2009).

II. Propriétés de surface de bactéries sensibles et résistantes à Cbn BM1

Des travaux précédents réalisés au laboratoire sur la mésentéroïne 52A, une bactériocine de classe IIa, avaient suggéré l'existence d'une relation entre les propriétés de surface, déterminées selon la méthode M.A.T.S., et le degré de pénétration de la bactériocine dans la membrane de la cellule cible ou le phénomène de sensibilité/résistance.

A cette étape des travaux de thèse, une quantité suffisante de Cbn BM1 remplissant les critères de pureté était disponible. Il a alors été nécessaire de déterminer le ou les modèles bactériens sur lesquels devaient porter les études de mécanisme d'action de Cbn BM1.

La caractérisation des propriétés physico-chimiques des surfaces de bactéries a été réalisée afin de sélectionner des souches présentant des propriétés de surface différentes et d'analyser le lien pouvant exister entre ces propriétés et les phénomènes de sensibilité/résistance à Cbn BM1.

II.1. Introduction

L'enveloppe des bactéries à Gram positif est formée par de nombreux composants tels que le peptidoglycane, la "S-layer", la membrane phospholipidique et ses protéines et éventuellement des structures telles que les flagelles. Cette enveloppe constitue alors l'interface entre la bactérie et son environnement direct. Cette interface est de nature complexe et joue un rôle majeur dans de nombreux processus physiologiques tels que la protection vis-à-vis des différents stress, l'import de nutriments, la division ou l'adhésion et présente une cible d'intérêt pour de nombreux composés antibactériens.

Parmi les composés causant des dommages à l'enveloppe bactérienne, les bactériocines ont été décrites comme interagissant avec les membranes (Moll *et al.*, 1999). Parmi celles-ci, il est admis que les bactériocines de classe IIa interagissent avec la surface bactérienne. Celles-ci sont toutes cationiques et amphiphiles et leur adsorption, et éventuellement leur pénétration au sein de la membrane, peut reposer sur l'interaction directe avec la surface des bactéries ciblées (Chen *et al.*, 1997a).

La charge positive de ces peptides faciliterait alors les interactions initiales avec les membranes bactériennes chargées positivement ou avec les parois *via* des interactions

électrostatiques (Kazazic *et al.*, 2002 ; Chen *et al.*, 1998 ; Chen *et al.*, 1997b). Différentes études concernant les interactions entre les bactériocines de classe IIa et des bactéries ou des modèles membranaires artificiels montrent que les charges de surface, la composition membranaire et/ou la longueur des chaînes d'acides gras jouent un rôle important dans la pénétration de la membrane (Naghmouchi *et al.*, 2007 ; Naghmouchi *et al.*, 2006) ; Zhao *et al.*, 2006b ; Vadyvaloo *et al.*, 2004) ; Limonet *et al.*, 2002 ; Vadyvaloo *et al.*, 2002 ; Chen *et al.*, 1998). Le caractère hydrophobe du domaine C-terminal permettrait sa pénétration dans le feuillet hydrophobe des membranes conduisant ainsi à la perméabilisation des membranes. Cette étape implique des interactions avec les lipides et/ou des protéines, telles que la mannose phosphotransférase, qui pourrait être nécessaire pour que les bactéries soient sensibles aux bactériocines de classe IIa (Hécharde *et al.*, 2001). La modulation de la composition membranaire (Nissen-Meyer *et al.*, 2009), des changements de sa composition en acides gras (Naghmouchi *et al.*, 2007 ; Vadyvaloo *et al.*, 2004), la teneur en D-alanine des acides téichoïques (Vadyvaloo *et al.*, 2004), la charge de surface (Vadyvaloo *et al.*, 2004) ou la composition globale de la membrane (Calvez *et al.*, 2010 ; Tessema *et al.*, 2009 ; Calvez *et al.*, 2007) ont été décrits comme impliqués dans les mécanismes de résistance aux bactériocines de classe IIa.

Les propriétés physico-chimiques de populations bactériennes peuvent être caractérisées par différentes techniques. L'adhésion microbienne aux solvants (M.A.T.S. pour *microbial adhesion to solvents*) est utilisée pour caractériser l'hydrophobicité et les propriétés de donneur/accepteur d'électron des surfaces bactériennes (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996). Cette méthode est basée sur la comparaison entre les affinités d'une population bactérienne pour différents solvants (voir "synthèse bibliographique").

Les surfaces bactériennes sont dynamiques et peuvent varier en fonction de l'environnement, notamment à travers l'association ou la dissociation de protons et différents développements théoriques et expérimentaux ont montré que les bactéries pouvaient être regardées comme des particules dites molles, c'est-à-dire comme des particules constituées d'un noyau imperméable entouré par une interface perméable complexe (Duval et Gaboriaud, 2010). Chez les bactéries Gram positives, la couche de peptidoglycane constitue l'interface perméable et le volume s'étendant du centre de la bactérie jusqu'à la membrane constitue le noyau dit "dur" (Duval et Gaboriaud, 2010). La perméabilité hydrodynamique, c'est-à-dire la capacité de l'environnement aqueux à pénétrer au sein de la couche perméable de la bactérie, ainsi que la densité de charge peuvent être déterminées à partir de l'analyse de mesures de

mobilité électrophorétique. Ce type d'approche a permis de caractériser les propriétés physico-chimiques des surfaces de *Shewanella* spp. (Dague *et al.*, 2006 ; Gaboriaud *et al.*, 2006), *Legionella pneumophila* (Gosselin *et al.*, 2011), *Enterococcus faecalis* (van Merode *et al.*, 2006), *Staphylococcus epidermidis* (Kiers *et al.*, 2001) et de *Listeria monocytogenes* (Potter *et al.*, 2005).

L'objectif du travail présenté au sein de ce chapitre est d'étudier le lien entre les propriétés physico-chimiques des surfaces bactériennes et la sensibilité des bactéries à Cbn BM1. Pour se faire, une large variété de souches appartenant à différents genres a été considérée et leurs propriétés de surface ont été estimées par les approches d'adhésion aux solvants et de mesures de mobilité électrophorétiques. Les analyses de ces dernières ont été réalisées à l'aide des modèles initialement développés par Ohshima (2000). Une analyse en composante principale (Jolliffe, 2002) a été également entreprise afin de mener une analyse pertinente des données obtenues en vue d'établir le lien entre les propriétés déterminées et les phénotypes de sensibilité/résistance à Cbn BM1.

II.2. Matériel et méthodes

II.2.1. Souches bactériennes et conditions de culture

Les souches bactériennes utilisées pour cette étude proviennent à la fois de collections publiques et de la collection de souches propre à notre laboratoire. Les souches de *Listeria* et de *Carnobacterium* ont été cultivées en milieu TSB-YE (Biokar Diagnostics, Beauvais, France). Les souches d'*Enterococcus* ont été cultivées sur milieu Elliker (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) et les *Leuconostoc* et *Lactobacillus* sur milieu MRS (Biokar Diagnostics, Beauvais, France). Toutes les souches ont été incubées à leur température optimale de croissance (Tableau 10). Les bactéries ont été récoltées après seize heures de croissance dans 50 mL de milieu ensemencé à une D.O. de 0,01. Les souches sont conservées dans du milieu supplémenté en glycérol (10%) à -30°C et propagées deux fois avant utilisation.

II.2.2. Détermination de l'hydrophobicité de surface et du caractère acide/base de Lewis

L'adhésion microbienne aux solvants (M.A.T.S.) a été utilisée pour déterminer les propriétés d'hydrophobicité de surface des souches ainsi que leur caractère acide/base de

Lewis (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996). Le solvant polaire peut être soit accepteur ou donneur d'électrons et est comparé avec un solvant apolaire présentant une tension de surface similaire. Les couples de solvants suivant ont été retenus : le chloroforme (accepteur d'électron) et l'hexadécane, l'acétate d'éthyle (donneur d'électron) et le décane, le diéthyléther (donneur d'électron) et l'hexane. Avant l'expérimentation, les bactéries sont lavées trois fois par centrifugation-resuspension (10 min, 3500 g, 20 °C) dans une solution de NaCl ($1,5 \cdot 10^{-1}$ M). Une suspension microbienne contenant approximativement 10^8 ufc.mL⁻¹ dans 1,2 mL de NaCl ($1,5 \cdot 10^{-1}$ M) est vortexée pendant 90 secondes avec 0,2 mL de solvant. Le mélange est laissé à reposer pendant 15 minutes afin de laisser les phases se séparer. L'affinité des bactéries pour chaque solvant est alors calculée selon la formule suivante : Pourcentage d'affinité = $100 \times (A/A_0)$ où A_0 et A correspondent à la D.O. à 660 nm avant et après le mélange. Chaque expérimentation a été réalisée en triplicat en utilisant trois cultures indépendantes.

Tableau 10. Souches bactériennes et concentration minimale inhibitrice (C.M.I.) de Cbn BM1. (S) : souche sensible à Cbn BM1, (R) : souche résistante à Cbn BM1. CIP, Collection de l'Institut Pasteur, Paris, France; DSM, Deutsche Sammlung von Mikro-Organismen and Zellkulturen, Göttingen, Germany; SLCC, Special *Listeria* Culture Collection, University of Würzburg, Germany; LMA, Laboratoire de Microbiologie Alimentaire, private collection, Nancy-Université Nancy, France. D'après Jasniewski *et al.*, 2008.

Souches bactériennes	Température d'incubation	C.M.I. (mg.L ⁻¹)
<i>Carnobacterium divergens</i> DSM 20623 (S)	30	0.625
<i>C. gallinarum</i> DSM4 847 (S)	25	0.625
<i>C. maltaromaticum</i> DSM 20730 (S)	30	0.625
<i>C. mobile</i> DSM 4848 (S)	30	0.625
<i>C. viridans</i> CIP 107728 (R)	25	> 250
<i>Enterococcus. durans</i> CIP 55125 (S)	37	2
<i>E. faecium</i> LMA 63 (R)	37	> 250
<i>E. faecalis</i> CIP 76117 (S)	37	2
<i>Lactobacillus fermentum</i> DSM 20052 (R)	37	> 250
<i>Lb. helveticus</i> DSM 20075 (R)	37	> 250
<i>Lb. plantarum</i> DSM 20174 (R)	30	> 250
<i>Leuconostoc citreum</i> CIP 103405 (R)	30	> 250
<i>Ln. mes. dextranicum</i> LMA 131 (R)	30	> 250
<i>Ln. mes. mesenteroides</i> LMA 7 (R)	30	> 250
<i>Listeria innocua</i> CIP 12511 (S)	30	4
<i>L. ivanovii</i> CIP 12510 (S)	30	4
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313 (S)	37	4
<i>L. seeligeri</i> SLCC 3954 (S)	37	4

II.2.3. Détermination de la perméabilité hydrodynamique et de la densité de charge des surfaces

Afin de déterminer la perméabilité hydrodynamique et de la densité de charge des surfaces bactériennes, la mobilité électrophorétique des souches a été mesurée à 25 °C à l'aide du Zetaphormeter IV (CAD Instrumentation, France) équipé d'un système de calcul des trajectoires vélocimétriques. Avant l'expérimentation, les bactéries sont lavées trois fois par centrifugation-resuspension (10 min, 3500 g, 20 °C) dans une solution de KCl (10^{-6} M). Pour chaque mesure, environ 1 mL de suspension bactérienne lavée est ajoutée à 20 mL de solution de KCl afin d'avoir environ 100 bactéries dans la cellule d'électrophorèse en quartz. Les mesures ont été réalisées à différentes forces ioniques de KCl, variant de 10^{-3} M à 0.5 M, sous un champ électrique constant (800V/m). Les valeurs de mobilité électrophorétique ont été obtenues à partir d'une centaine de trajectoires pour chaque concentration ionique testée.

Les données expérimentales ont été interprétées en suivant la procédure présentée en détail par Gosselin *et al.* (2011). Les bactéries ont donc été assimilées à des particules molles et leur mobilité analysées grâce à la théorie développée par Ohshima (2001). La modélisation des données expérimentales a été obtenue après ajustement des paramètres $1/\lambda_0$ et ρ_0 par la méthode des moindres carrés (Figure 20).

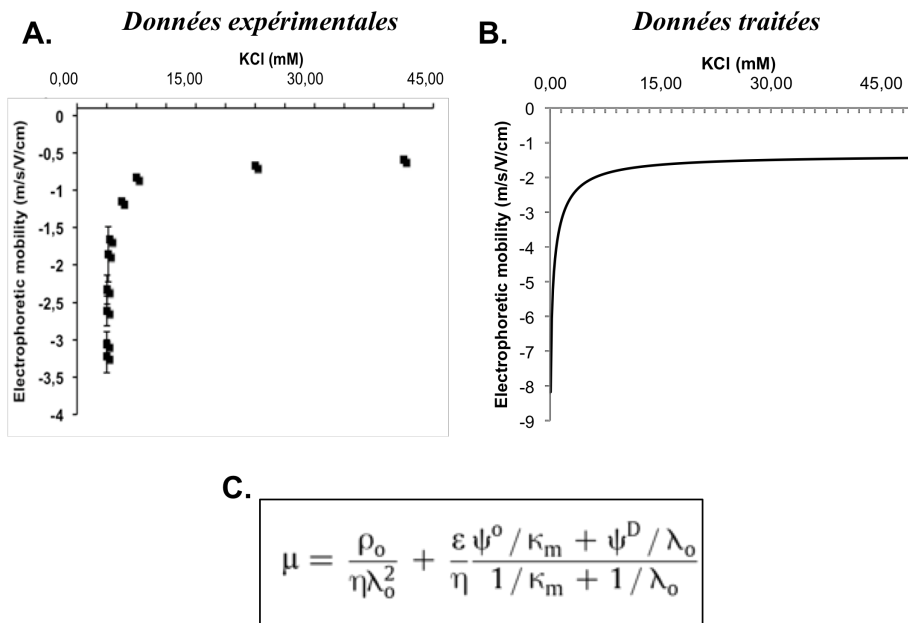


Figure 20. Exemple de données utilisées pour la détermination des propriétés physico-chimiques des surfaces bactériennes. Les valeurs expérimentales de mobilité électrophorétique μ (A) sont modélisées à l'aide d'une courbe suivant la méthode des moindres carrés (B). L'équation de la courbe (C) permet alors d'obtenir les paramètres $1/\lambda_0$ et ρ_0 à partir des valeurs de μ expérimentales.

La perméabilité ($1/\lambda_0$) traduit la distance sur laquelle les ions peuvent pénétrer la couche perméable de la particule molle et le paramètre ρ_0 correspond à la densité de charge au sein de cette couche. Comme l'épaisseur de la frange polymérique de chaque bactérie est inconnue, deux épaisseurs théoriques (d) ont été testées : 20 nm et 100 nm (Firtel *et al.*, 2004).

II.2.4. Analyse en composante principale

Les résultats obtenus à partir des mesures d'adhésion aux solvants et de mobilité électrophorétique ont été analysés par la méthode d'analyse en composante principale en utilisant le logiciel The Unscrambler v7.6 (CAMO ASA) (Jolliffe, 2002). Cette approche mathématique de réduction dimensionnelle permet de grouper les différentes souches bactériennes analysées sur la base des différents paramètres testés.

II.3. Résultats

Les propriétés de surface de population bactériennes ont été caractérisées pour une grande diversité de souches sensibles ou résistantes à Cbn BM1. Parmi les différentes souches testées, celles appartenant aux genres *Carnobacterium*, exception faite de *C. viridans* CIP107726, *Enterococcus*, mis à part *E. faecium* LMA 63, et *Listeria* sont sensibles à Cbn BM1 avec des valeurs de concentrations minimales inhibitrices variant de 0,625 mg.L⁻¹ à 4 mg.L⁻¹. Les souches appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Leuconostoc* sont quant à elles toutes résistantes à Cbn BM1 (Tableau 10). L'analyse de la distribution des populations concernant les propriétés électrophorétiques ont montré qu'elles étaient homogènes en terme de propriétés électro-hydrodynamiques (van der Mei et Busscher, 2001).

II.3.1. Perméabilité hydrodynamique et densité de charge des surfaces bactériennes

La mobilité électrophorétique des dix-huit souches testées a été mesurée en fonction de la concentration en KCl. Pour toutes les populations, les profils de mobilité présentent une variation en fonction de la force ionique (Figure 21). Parallèlement à l'augmentation de la force ionique, la mobilité électrophorétique diminue montrant ainsi la titration par les électrolytes des charges situées dans la zone perméable de la bactérie. Les valeurs de mobilité atteignent un plateau de valeur non nulle à partir d'une force ionique suffisamment élevée

(environ 100 mM). Un tel plateau est caractéristique des particules dites molles et traduit la présence d'une couche perméable de polyélectrolytes à la surface des bactéries (Duval et Ohshima, 2006 ; Duval *et al.*, 2005).

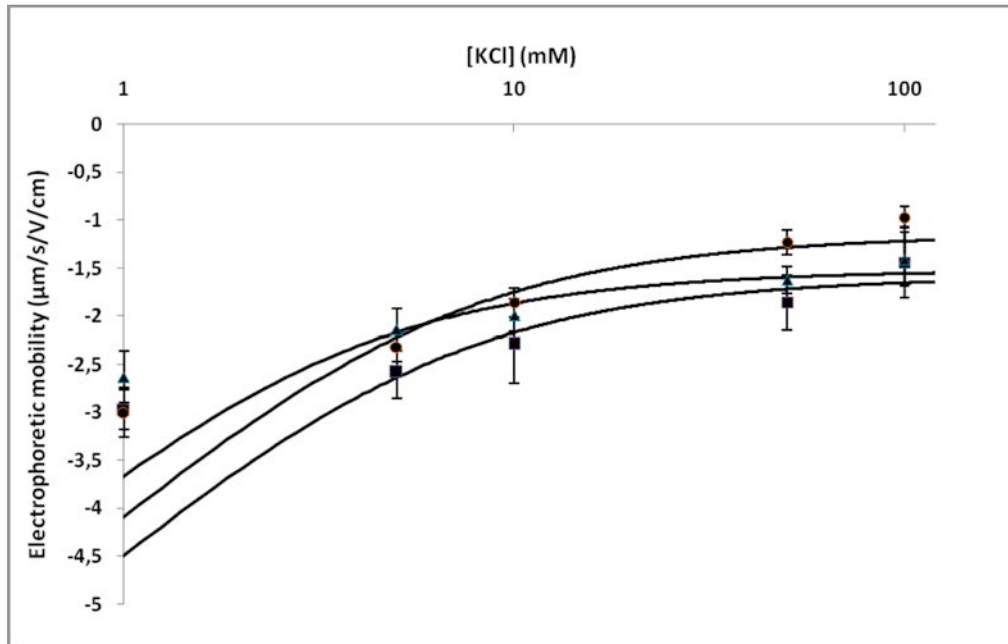


Figure 21. Mobilité électrophorétique en fonction de la concentration en KCl de *Carnobacterium mobile* DSM 4848 (▲), *Enterococcus durans* CIP55125 (●) et *Listeria innocua* CIP12511 (■). Les lignes continues correspondent aux courbes théoriques ajustées aux données expérimentales. Chaque point représente la moyenne d'au moins 100 trajectoires.

Les données ainsi obtenues ont été traitées en suivant la théorie développée par Ohshima (2001) (Figure 21). Pour les plus faibles forces ioniques testées, les données expérimentales présentent des valeurs plus faibles que les courbes théoriques, ce qui est couramment observable pour les mesures électrocinétiques de bactéries (Duval et Gaboriaud, 2010). Un tel phénomène pourrait être expliqué par un phénomène de polarisation de la double-couche électrique et/ou par une turgescence hétérogène de la couche perméable à faible force ionique. L'analyse des données suivant la théorie des particules molles permet d'estimer pour chaque souche testée la perméabilité ($1/\lambda_0$), c'est-à-dire la distance sur laquelle des électrolytes peuvent diffuser, et la densité de charge (ρ_0) (Figure 22 et Figure 23).

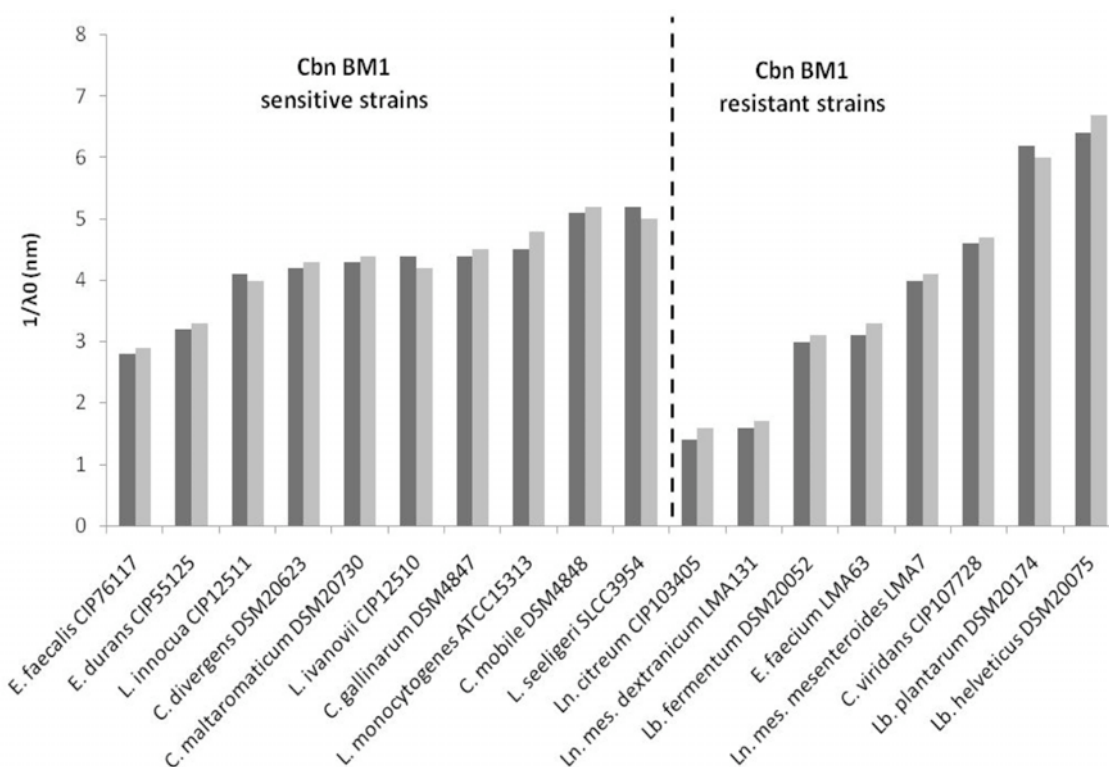


Figure 22. Perméabilité hydrodynamique ($1/\lambda_0$ (nm)) de la couche perméable calculée à partir des données électrocinétiques. La détermination de $1/\lambda_0$ a été réalisée pour des valeurs de d values de 20 nm (barres sombres) et de 100 nm (barres claires).

Il apparaît que ces paramètres varient significativement entre les différentes souches. Les valeurs de perméabilité varient de 1,4 nm à 6,7 nm avec de faibles différences entre les deux valeurs de d retenues. Les valeurs de densités de charges quant à elle varient de -1,5 mM à -19,5 mM. Ces valeurs soulignent des propriétés électro-hydrodynamiques différentes pour les différentes souches testées. *Ln. citreum* CIP 103405 et *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* LMA 131 présentent une forte densité de charges avec des valeurs de respectivement -19,5 mM et -18,5 mM (pour $d = 20$ nm). Leur perméabilité est relativement faible avec des valeurs de 1,4 nm et 1,6 nm (pour $d = 20$ nm). *Lb. plantarum* DSM 20174 et *Lb. helveticus* DSM 20075 sont faiblement chargées et présentent les plus grandes épaisseurs perméables. La distribution des valeurs entre les souches semble être dépendante des genres. Les valeurs sont homogènes pour les souches appartenant aux genres *Enterococcus* et *Carnobacterium* alors qu'une grande variation de ces paramètres est observable pour les genres *Leuconostoc* et *Lactobacillus*.

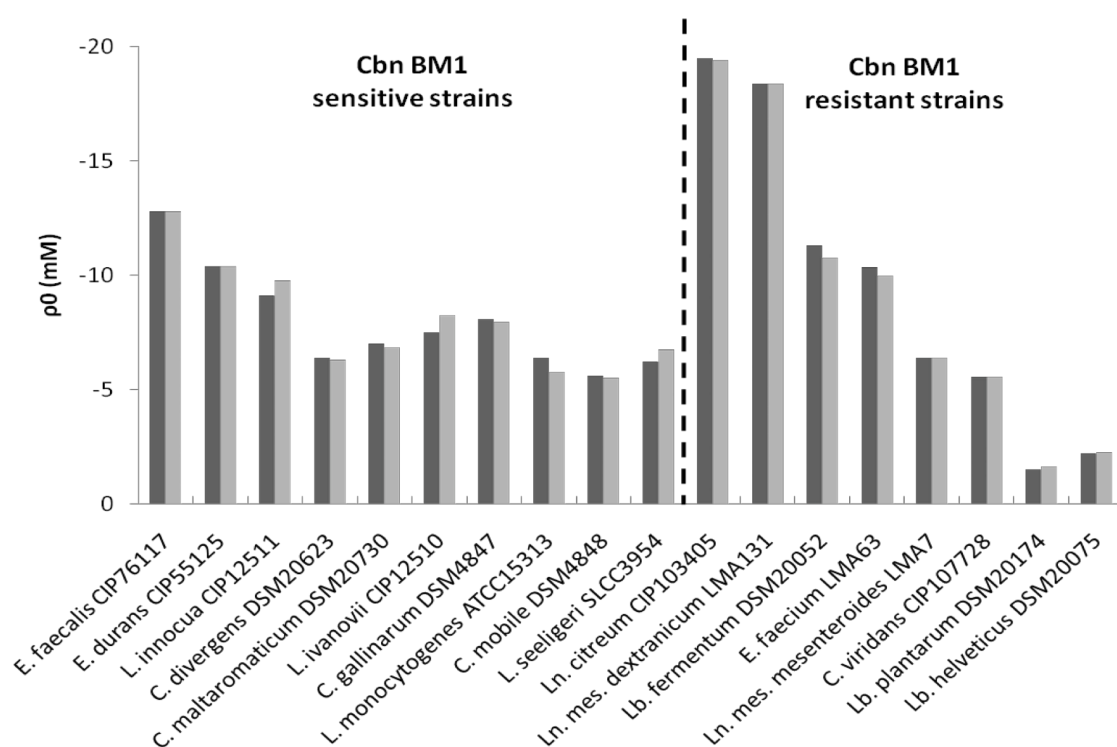


Figure 23. Densité volumique des charges électriques (ρ_0 (mM)) de la couche perméable calculée à partir des données électrocinétiques. La détermination de $1/\lambda_0$ a été réalisée pour des valeurs de d values de 20 nm (barres sombres) et de 100 nm (barres claires).

Les souches résistantes à Cbn BM1 présentent à la fois les densités de charge et les perméabilités les plus hautes et les plus basses en comparaison avec les souches sensibles. Ceci explique donc la grande amplitude de variation de ces paramètres entre les souches résistantes testées (Tableau 11). Les bactéries sensibles présentent une perméabilité de $4,2 \pm 0,7$ nm et une densité de charge moyenne comprise entre $-8,0 \pm 2,2$ mM et $-8,1 \pm 2,3$ mM, selon la valeur de d retenue. Les écarts types obtenus pour les souches résistantes sont environ trois fois supérieurs à ceux des souches sensibles.

Tableau 11. Perméabilité hydrodynamique moyenne ($1/\lambda_0$) et densité de charge moyenne (ρ_0) pour les souches résistantes et sensibles à Cbn BM1 calculées pour des valeurs de d de 20 nm et de 100 nm.

Souches	$1/\lambda_0$ (nm)		ρ_0 (mM)	
	$d=20$ nm	$d=100$ nm	$d=20$ nm	$d=100$ nm
Sensibles à Cbn BM1	$4,2 \pm 0,7$	$4,2 \pm 0,7$	$-8,0 \pm 2,2$	$-8,1 \pm 2,3$
Résistantes à Cbn BM1	$3,7 \pm 1,9$	$3,9 \pm 1,9$	$-9,4 \pm 6,8$	$-9,3 \pm 6,7$

II.3.2. Hydrophobicité et caractère acide/base de Lewis des surfaces bactériennes

L'adhésion microbienne aux solvants (M.A.T.S.) a été utilisée pour déterminer l'hydrophobicité et le caractère donneur/accepteur d'électrons des surfaces bactériennes (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996) (Tableau 12).

L'affinité des souches de *Listeria*, de *Leuconostoc* et d'*Enterococcus* pour les solvants apolaires (hexane, décane et hexadécane) est proche de zéro, indiquant un caractère plutôt hydrophile. *Enterococcus faecium* LMA 63, une souche résistante, constitue toutefois une exception en présentant une affinité relativement forte pour le décane et l'hexane, indiquant ainsi le caractère hydrophobe de cette souche. Parmi les souches de *Lactobacillus* testées, qui sont toutes résistantes, *Lactobacillus helveticus* DSM 20075 présente une forte affinité pour les solvants apolaires indiquant son caractère hydrophobe alors que les deux autres souches sont plutôt hydrophiles. Les bactéries appartenant au genre *Carnobacterium* présentent une affinité pour l'hexane et/ou l'hexadécane, mis à part *Carnobacterium mobile* DSM 4848, traduisant ainsi une surface hydrophobe.

Tableau 12. Affinités des souches pour les solvants exprimées en pourcentage de partition dans ces derniers (écarts-types <10%). (S) : souche sensible à Cbn BM1, (R) : souche résistante à Cbn B2.

Souches bactériennes	Pourcentage d'affinité pour :					
	Chloroforme	Hexadécane	Acétate d'éthyle	Décane	Diéthyl Ether	Hexane
<i>C. divergens</i> DSM 20623 (S)	90	44	6	3	0	25
<i>C. gallinarum</i> DSM 4847 (S)	100	64	27	5	9	93
<i>C. maltaromaticum</i> DSM 20730 (S)	86	41	0	0	0	62
<i>C. mobile</i> DSM 4848 (S)	24	5	25	0	24	3
<i>C. viridans</i> CIP 107728 (R)	79	28	12	0	5	6
<i>Enterococcus durans</i> CIP 55125 (S)	31	5	32	6	26	7
<i>E. faecium</i> LMA 63 (R)	37	29	79	49	68	55
<i>E. faecalis</i> CIP 76117 (S)	27	6	4	5	6	1
<i>Lactobacillus. fermentum</i> DSM 20052 (R)	3	2	5	2	7	5
<i>Lb. helveticus</i> DSM 20075 (R)	97	71	41	27	27	31
<i>Lb. plantarum</i> DSM 20174 (R)	43	14	2	0	2	4
<i>Leuconostoc citreum</i> CIP 103405 (R)	6	2	31	0	44	8
<i>Ln. mes. dextranicum</i> LMA 131 (R)	3	3	7	4	12	0
<i>Ln. mes. mesenteroides</i> LMA 7(R)	2	3	14	0	13	0
<i>Listeria innocua</i> CIP 12511 (S)	29	0	52	0	50	0
<i>L. ivanovii</i> CIP 12510 (S)	42	0	37	0	30	0
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313 (S)	21	4	17	4	14	7
<i>L. seeligeri</i> SLCC 3954 (S)	17	4	20	7	16	10

Les bactéries des genres *Listeria* et *Enterococcus*, mis à part *E. faecalis* CIP 76117, présentent une haute affinité pour le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le diéthyléther comparativement à l'hexadécane, au décane et à l'hexane. Ceci indique un caractère amphotère, à la fois acide et base de Lewis. Les souches de *Leuconostoc* montrent une plus haute affinité pour les solvants basiques comme l'acétate d'éthyle et le diéthyléther, indiquant un caractère d'acide de Lewis plus prononcé. Les souches de *Carnobacterium*, sauf *C. mobile* DSM 4848, présentent une forte affinité pour le chloroforme, indiquant ainsi des propriétés de base de Lewis.

II.3.3. Analyse en composante principale des propriétés de surface

Une analyse en composante principale a été réalisée en incluant l'ensemble des données expérimentales (affinités pour les différents solvants, perméabilités et densités de charge).

Cette analyse a mis en évidence trois groupes de paramètres. Le premier groupe est constitué de trois paramètres : l'affinité pour l'hexane, celle pour l'hexadécane et celle pour le chloroforme. Il apparaît que ces propriétés régissent la première composante principale (axe P.C.1 qui représente 49,7% de la variation totale). Le deuxième groupe inclut les affinités pour l'acétate d'éthyle, pour le diéthyléther et pour le décane. Ce groupe forme la seconde composante principale (axe P.C.2 qui représente 28,1% de la variation totale). Le troisième groupe est composé de la perméabilité hydrodynamique et de la densité de charge, les deux paramètres issus des essais de mobilité électrophorétique. La localisation de ces deux paramètres à proximité de l'origine du graphique traduit une contribution non significative de ces derniers pour l'analyse en composante principale.

Cette analyse permet de séparer les souches bactériennes testées en fonction de leurs propriétés de surface (Figure 24) et montre une certaine proximité entre de nombreuses bactéries appartenant à des genres différents.

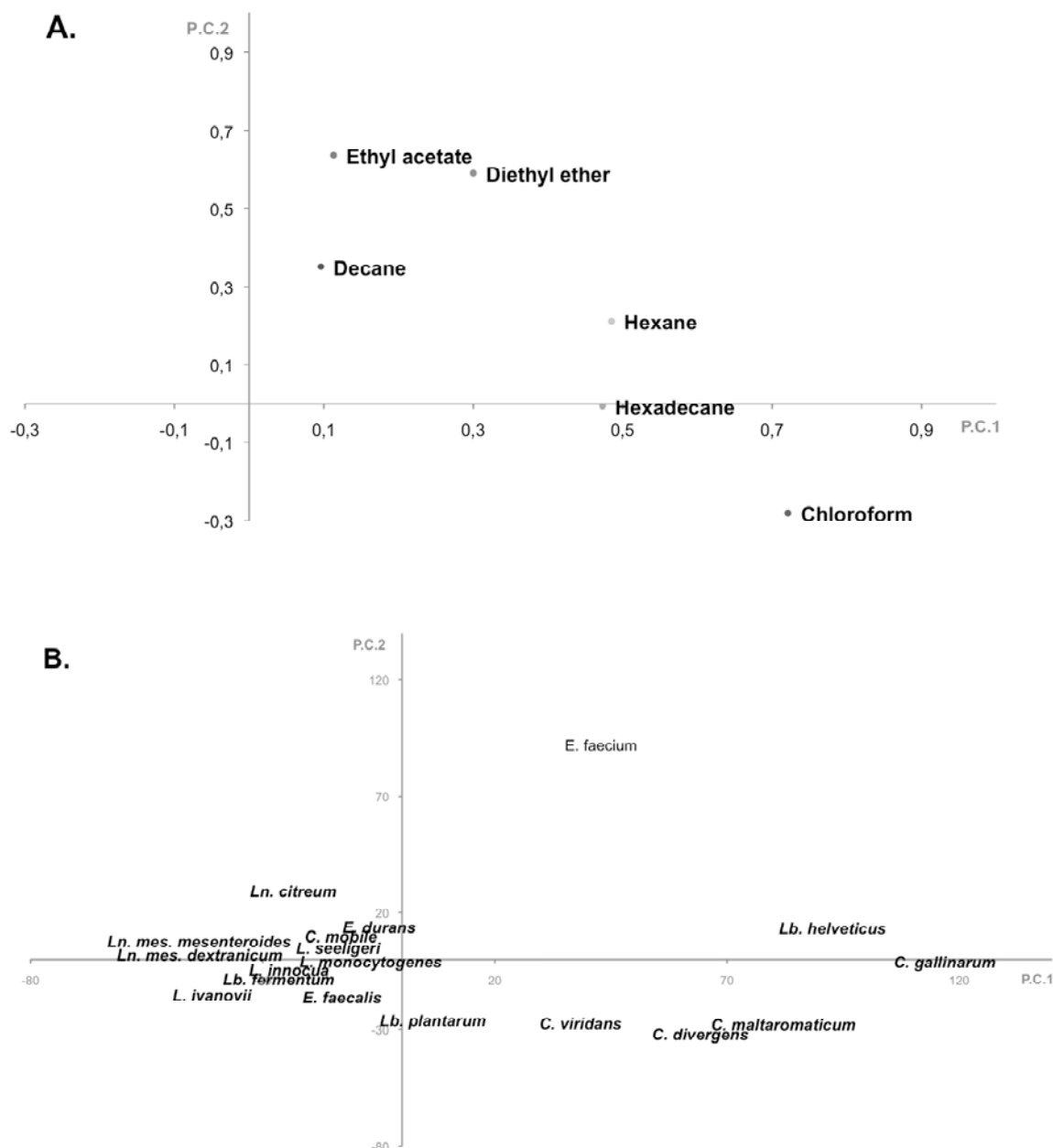


Figure 24. Analyse en composante principale des données obtenues expérimentalement. Le panneau A indique la contribution de chaque paramètre pour les deux composantes principales (P.C.1 et P.C.2). Le panneau B représente la distribution des souches selon ces composantes principales.

Ainsi, *Lb fermentum* DSM 20052, *C. divergens* DSM 20623, *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* LMA 7, *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* LMA 131, *E. faecium* LMA 63, *E. durans* CIP 55125 et les bactéries du genre *Listeria* sont regroupées. *E. faecium* LMA 63 apparaît comme étant clairement différent des autres *Enterococcus* et des autres bactéries testées. *Lb plantarum* DSM 20174, *Lb helveticus* DSM 20075 et les souches de *Carnobacterium* sont distribuées le long de l'axe constitué par la première composante

principale, montrant ainsi de grandes différences entre leurs propriétés de surface. La forte dispersion des souches de *Listeria*, des deux souches sensibles d'*Enterococcus* et des *Carnobacterium* indiquent une grande diversité des propriétés de surface parmi les bactéries sensibles à Cbn BM1. Les souches de *Leuconostoc*, résistantes, sont groupées mais dans la même zone que les *Listeria* qui sont quant à elles sensibles à Cbn BM1. Les souches de *Carnobacterium* ou de *Lactobacillus* montrent la même variabilité de leurs propriétés bien qu'elles présentent une sensibilité, pour les premières, ou une résistance à Cbn BM1, pour les secondes.

II.4. Discussion

Les propriétés de surface ont été caractérisées pour une grande diversité de souches bactériennes sensibles ou résistantes à la bactériocine de classe IIa Cbn BM1. L'analyse en composante principale de ces propriétés montre qu'elles ne permettent pas de discriminer les souches en deux groupes, ou plus, en lien avec leur phénotype de résistance/sensibilité.

L'hydrophobicité de surface peut être influencée par différents composants de la paroi bactérienne tels que les protéines localisées en surface, les acides lipotéichoïques et les lipides (Schär-Zammaretti et Ubbink, 2003 ; Ming et Daeschel, 1995) alors que les surfaces riches en polysaccharides sont généralement faiblement chargées et hydrophiles (Schär-Zammaretti et Ubbink, 2003). Il a également été montré que des modifications des propriétés de surface, dont notamment la charge, sont impliquées dans la résistance à des bactériocines. Ainsi, les variants de *L. monocytogenes* Scott A résistants à la nisine sont moins hydrophobes que les variants sensibles (Ming Xintian et Daeschel, 1993). De même, il a été montré par une approche de fixation du cytochrome c, que les souches de *L. monocytogenes* résistantes aux bactériocines de classe IIa ont une surface plus positivement chargée que celle des souches sensibles. Ceci serait dû à des modifications de la D-alanylation des acides téichoïques et à la lysinilation des phospholipides (Vadyvaloo *et al.*, 2004). La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (I.R.T.F.) a montré des différences au niveau des acides gras, des protéines et des polysaccharides entre les souches de *L. monocytogenes* sensibles et résistantes à la sakacine P (Tessema *et al.*, 2009). D'autres analyses d'I.R.T.F. ont également permis de révéler des différences structurales entre des souches d'*Enterococcus faecalis* JH2-2 sensibles ou résistantes à la divercine RV41 (Calvez *et al.*, 2010). Ces différences sont visibles principalement au niveau des acides gras et des polysaccharides et pourraient refléter des changements dans la paroi et dans la membrane bactérienne. Ces résultats sont en accord

avec les observations faites sur *E. faecium* LMA 63, la seule souche résistante du genre *Enterococcus*, qui présente une surface plus hydrophobe et des propriétés de surface différentes des autres souches d'*Enterococcus* qui sont sensibles. Cette relation entre une surface plus hydrophobe et un phénotype de résistance n'a cependant pas été observée pour les autres souches. Toutefois, la littérature montre que les souches résistantes présentent d'autres modifications liées à leur phénotype de résistance. Ainsi, les souches résistantes de *L. monocytogenes* adsorbent une quantité plus faible de nisine en raison d'une diminution du taux de phospholipides anioniques (Ming et Daeschel, 1993) ou montrent une diminution de l'expression du gène *mptA* (Vadyvaloo *et al.*, 2004). Des résistants à la sakacine P présentent également des modifications au niveau d'autres paramètres tels que la croissance, la tolérance à des stress, la formation de biofilms et montrent des variations de la régulation de l'expression de l'opéron de la mannose phosphotransférase (Tessema *et al.*, 2009). Les souches résistantes d'*Enterococcus* présentent des modifications de l'expression des gènes codant pour des phosphotransférases, pour le facteur σ^{54} ou pour une glycérophosphodiesterase (Calvez *et al.*, 2010). Ainsi, bien que l'adhésion aux solvants permette la prédiction des comportements d'adhésion (Takahashi *et al.*, 2010) ou de formation de biofilms (Kouidhi *et al.*, 2010) au niveau d'une population bactérienne, cette approche doit être trop macroscopique pour permettre d'étudier des mécanismes ayant lieu à l'échelle d'une seule bactérie (Dorobantu *et al.*, 2008).

Une autre approche expérimentale, basée sur des mesures électrocinétiques, a été utilisée pour caractériser la surface des souches retenues pour cette étude. La perméabilité hydrodynamique et la densité de charge, qui sont intrinsèquement liées à la nature et à la composition de l'enveloppe bactérienne, varient beaucoup parmi les souches testées. Une telle hétérogénéité de ces paramètres a déjà été mentionnée pour des souches d'*E. faecalis* (van Merode *et al.*, 2006) ou de *Legionella pneumophila* (Gosselin *et al.*, 2011). Aucune corrélation n'est observable entre la sensibilité vis-à-vis de Cbn BM1 et les paramètres électrocinétiques, contrairement à ce qui a été décrit concernant la protamine, un peptide cationique antimicrobien (Potter *et al.*, 2005). Cependant, les souches sensibles montrent des valeurs de paramètres électrocinétiques relativement plus homogènes que les souches résistantes. Ainsi, les valeurs les plus extrêmes ont ainsi été obtenues pour deux souches de *Leuconostoc* et deux *Lactobacillus* qui sont des souches résistantes. Ces paramètres doivent moduler l'accessibilité de la bactériocine à la membrane qui est la cible du mécanisme d'action. En effet, des enveloppes caractérisées par une forte densité de charge correspondent à une faible perméabilité hydrodynamique et donc à une faible pénétration d'électrolytes et

une structure plus rigide (Duval et Gaboriaud, 2010), ce qui pourrait constituer une barrière contre l'accessibilité de Cbn BM1 à la membrane.

En conclusion, le M.A.T.S. et les analyses électrocinétiques montrent une grande diversité des propriétés physico-chimiques des surfaces des souches testées et ne permet pas de discriminer ces souches en fonction de leur sensibilité/résistance à la bactériocine Cbn BM1. Comme il a été déjà mentionné par différents auteurs (Nissen-Meyer *et al.*, 2009 ; Vadyvaloo *et al.*, 2004), de nombreux mécanismes doivent contribuer aux phénotypes de sensibilité/résistance. Les propriétés de surface, qui doivent jouer un rôle important dans les mécanismes de sensibilité/résistance au niveau moléculaire, ont cependant un faible pouvoir de prédiction pour discriminer les souches au niveau d'une population globale.

La détermination des propriétés de surface à l'échelle d'une seule bactérie par d'autres techniques pourrait néanmoins être nécessaire pour mettre en évidence une possible corrélation entre ces paramètres et la sensibilité à Cbn BM1.

Cette étude a été rédigée sous forme d'une publication acceptée dans "Journal of Applied Microbiology".

III. Mécanismes d'action de Cbn BM1

III.1. Introduction

Les études présentées au sein de ce chapitre portent sur l'élucidation des mécanismes d'action de Cbn BM1. Celles-ci ont été réalisées sur des modèles bactériens afin de s'affranchir des différents biais existants lors d'études réalisées sur des modèles de membranes artificielles tels que des liposomes.

L'étude des propriétés de surface présentée précédemment a révélé qu'il n'était pas possible d'établir un lien direct entre ces propriétés et la sensibilité des souches analysées. Par conséquent, les propriétés physico-chimiques des surfaces n'ont donc pas permis de discriminer différents modèles bactériens basés sur ces critères.

Le choix des modèles bactériens a donc été arrêté premièrement sur *Carnobacterium maltaromaticum* DSM20730 en raison de sa plus grande sensibilité à Cbn BM1 au sein du spectre d'activité (Jasniewski *et al.*, 2008). Le second modèle retenu est *Listeria monocytogenes* EGDe en raison de l'existence d'un mutant délété pour la mannose perméase (*L. monocytogenes* EGDe Δ *mptI*), le récepteur potentiel des bactériocines de classe IIa.

III.2. Matériel et méthodes

III.2.1. Souches bactériennes et conditions de culture

Carnobacterium maltaromaticum DSM20730 a été obtenu à partir de la collection allemande de microorganismes et de cultures cellulaires (DSMZ, Braunschweig, Allemagne). Les cultures ont été réalisées en bouillon trypticase soja complétée par de l'extrait de levure (Biokar, Beauvais, France) à 30 ° C.

Listeria monocytogenes EGDe et Δ *mptI* nous ont été transmises par Kurt W. Miller (Université du Wyoming). Les cultures ont été réalisées en milieu TSB-YE (Biokar, Beauvais, France) à 37 °C.

Les souches sont conservées en TSB-YE supplémenté avec du glycerol (20% v/v) à -25°C et propagées deux fois avant chaque expérimentation.

III.2.2. Bactériocine

La bactériocine Cbn BM1 de synthèse a été solubilisée dans un tampon phosphate (5 mM, pH 6,5). La concentration des solutions a été vérifiée par mesure d'absorbance à 280 nm ($\epsilon = 14\,180\text{ cm}^{-1}.\text{M}^{-1}$).

III.2.3. Sondes fluorescentes

La sonde fluorescente 1,6-Diphényl-1,3,5-hexatriène-4-triméthylammonium (TMA-DPH) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a été préparée dans du N, N-diméthylformamide à une concentration finale de 2 mM. La sonde 1,6-Diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH) (Sigma-Aldrich) a été préparée dans du tétrahydrofurane à une concentration finale de 2 mM. Le potentiel transmembranaire $\Delta\psi$ a été mesuré avec la sonde fluorescente 3,30-dipropylthiadicarbocyanine-iodure (DiSC₃(5)) (Sigma-Aldrich). Le potentiel transmembranaire ΔpH a été mesuré à l'aide de la sonde fluorescente 20,70-bis-(2-carboxyéthyl)-5(et 6) carboxyfluorescéine acétoxyméthyl ester (BCECF-AM) (Sigma-Aldrich). La nigéricine et la valinomycine (Sigma-Aldrich) ont été préparées respectivement dans le chloroforme ou le diméthylsulfoxyde à une concentration finale de 10 mM.

III.2.4. Détermination de l'intégrité membranaire.

L'intégrité des membranes a été évaluée à l'aide du kitDead/Live[®] BacLight[™] (Invitogen). Brièvement, les bactéries ont été récoltées en phase exponentielle de croissance (DO = 0,2) ou en phase stationnaire de croissance (DO = 1,2) par centrifugation (5 000 g à 4 ° C pendant 10 min) et lavées avec une solution de NaCl (9 g.L⁻¹). Les bactéries ont été remises en suspension dans une solution de NaCl (9 g.L⁻¹) à une DO = 1,2 et Cbn BM1 a été ajoutée. Le traitement a été réalisé sur une durée de 60 minutes. Après le traitement, des sondes fluorescentes (Syto9[®] et iodure de propidium) ont été ajoutées et le marquage réalisé pendant 15 minutes selon les recommandations du fournisseur. Les cellules ont ensuite été filtrées sur filtre polycarbonate noir non fluorescents (0,22 μm) (Millipore) et le filtre a été monté sur lame de verre. Les observations ont ensuite été réalisées avec un microscope à épifluorescence (Leica Microsystems) afin de déterminer le ratio entre les bactéries présentant une membrane intacte (fluorescence verte) et celles avec une membrane endommagée (fluorescence rouge).

III.2.5. Mesure de l'anisotropie de fluorescence

Les bactéries ont été récoltées en phase exponentielle de croissance (DO = 0,2) ou en phase stationnaire de croissance (DO = 1,2) par centrifugation (5 000 g à 4 ° C pendant 10 min) et lavées trois fois avec le tampon (Na_2HPO_4 , 3g.L⁻¹; KH_2PO_4 , 6 g.L⁻¹; NaCl, 2 g.L⁻¹; and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 8g.L⁻¹, pH 7.6). Les culots cellulaires ont été resuspendus dans le même tampon pour obtenir une concentration finale d'environ 2.10^8 CFU.mL⁻¹. Les mesures d'anisotropie de fluorescence des cellules marquées avec le DPH ou le TMA-DPH ont été réalisées en utilisant un dispositif d'excitation continue (Fluofluidimeter, Regulest, Florange, France). La suspension bactérienne a été marquée avec du TMA-DPH ou du DPH pendant respectivement 7 et 30 min, (Bokas *et al.*, 2007). La bactériocine Cbn BM1 a été ajoutée à une concentration finale de 2,5 mg.L⁻¹ et le traitement a été réalisé pendant 60 minutes. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont respectivement de 365 et 425 nm. Cinq mesures d'anisotropie de fluorescence (Kuhry *et al.*, 1985) ont été réalisées pour chaque échantillon avec trois répétitions indépendantes.

III.2.6. Mesure des potentiels membranaires

Les bactéries ont été récoltées en phase exponentielle de croissance (DO = 0,2) ou en phase stationnaire de croissance (DO = 1,2), lavées deux fois et resuspendues dans un tampon (HEPES 50 mM, KCl 0,6 mM, glucose 0,2%, pH 7,0). Le potentiel $\Delta\psi$ a été mesuré à l'aide de la sonde DiSC3(5) (5 mM) (Sigma-Aldrich). Après addition de nigéricine (1,5 nM), pour dissiper le gradient de pH, Cbn BM1 (2,5 mg.L⁻¹), ou la valinomycine (1,5 nM) comme témoin positif, est ajoutée. Les mesures de fluorescence sont effectuées en utilisant un spectrofluorimètre FLX (SAFAS-Monaco, Monaco) à 622 (excitation) et 670 nm (émission) (Herranz *et al.*, 2001a, b). Le ΔpH a été mesuré en utilisant la sonde fluorescente BCECF-AM. Les bactéries sont marquées par choc acide (Molenaar *et al.*, 1991). Après addition de valinomycine (1,5 nM), pour dissiper le $\Delta\psi$, Cbn BM1 (2,5 mg.L⁻¹), ou la nigéricine (1,5 nM) comme témoin positif, a été ajoutée. La fluorescence a été mesurée à 502 (excitation) et 525 nm (émission). Les résultats sont exprimés en pourcentage de fluorescence initiale normalisée à 100%.

III.2.7. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

L'analyse de la sécrétion de protéines a été réalisée par spectroscopie infrarouge à

transformée de Fourier en mode réflexion totale atténuée (ATR-FTIR). Les bactéries ont été récoltées en phase exponentielle de croissance (DO = 0,2) ou en phase stationnaire de croissance (DO = 1,2) et lavées trois fois avec du NaCl (9 g.L⁻¹). Les suspensions bactériennes (DO = 0,5) réalisées dans du NaCl (9 g.L⁻¹) ont été traitées par Cbn BM1 (2,5 mg.L⁻¹) ou avec un volume équivalent de tampon phosphate. Après 30 minutes de traitement, les surnageants ont été recueillis et les mesures ont été effectuées à 25 ° C avec un spectromètre de Tensor 27 mi-FTIR Bruker (Bruker, Karlsruhe, Allemagne) équipé d'une cellule II bio-optiques et d'un détecteur ATR MCT (tellurure de mercure et de cadmium) refroidi avec de l'azote liquide (Bruker, Karlsruhe, Allemagne). La membrane a été fixée à 4 mm et la vitesse de balayage est de 20 kHz et 128 scanners ont été réalisés pour la référence et l'échantillon de 4000 à 500 cm⁻¹ avec 4 cm⁻¹ de résolution. Les spectres de la solution tampon ont été réalisés dans les mêmes conditions, et l'absorbance de la solution tampon et celle de Cbn BM1, selon les conditions, ont été soustraites des spectres de la solution de l'échantillon pour obtenir les spectres correspondant aux protéines. Tous les traitements de données ont été réalisés en utilisant le logiciel OPUS (Bruker, Karlsruhe, Allemagne). Les spectres d'absorbance brute ont été lissés à l'aide de neuf points avec la fonction de lissage Savitsky-Golay. Une correction élastique de base a été appliquée aux spectres qui ont ensuite été coupés entre 1720 et 1580 cm⁻¹, correspondant aux vibrations de la bande I, puis centrés et normalisés.

III.2.8. Mesures de topologie.

Les bactéries ont été récoltées en phase exponentielle de croissance (D.O. = 0,2) ou en phase stationnaire de croissance (D.O. = 1,2) et resuspendues à D.O. = 5 par centrifugation afin de concentrer la suspension bactérienne. Un volume de 2 ml de cette suspension a été déposé sur une lame de verre circulaire (30 mm de diamètre, VWR). Cbn BM1 (10 mg.L⁻¹), ou une quantité équivalente de tampon phosphate, a été ajoutée et l'incubation a été réalisée à 25 ° C. Après 30 minutes de traitement, la suspension bactérienne a été séchée sous un flux d'azote afin de réaliser des mesures de topologie en mode "air". Les mesures ont ensuite été réalisées à l'aide du microscope à force atomique MFP-3D-Bio (Asylum research, Santa Barbara, Californie) en mode contact avec un réglage de 512 pixels par ligne et 1 Hz de vitesse de balayage. Le traitement de l'image a été réalisé avec le logiciel fourni par le fabricant.

III.3. Résultats

III.3.1. Mécanismes d'action de Cbn BM1 sur *C. maltaromaticum* DSM20730

Il a été montré que différents paramètres changent selon l'état physiologique de la bactérie. Parmi ces ceux-ci, peuvent être cités la composition membranaire (Al-Qadiri *et al.*, 2008) (van de Rijn & Kessler, 1979) la composition globale de la bactérie (Ede *et al.*, 2004) ainsi que l'état énergétique de cette dernière (Russell & Cook, 1995). L'ensemble de ces changements peut conduire à des modulations de l'efficacité de différents composés antibactériens (Bisbiroulas *et al.*, 2011) ; (Mastronicolis *et al.*, 2010)(Verdon *et al.*, 2010) ; (Méchin *et al.*, 1999) dont les bactériocines de classe IIa (Vadyvaloo *et al.*, 2002) ; (Chen *et al.*, 1998). Par conséquent, les mécanismes d'action de Cbn BM1 ont été étudiés sur *C. maltaromaticum* DSM20730 à différents états physiologiques (phase exponentielle et phase stationnaire de croissance). Dans un premier temps, l'action de Cbn BM1 sur l'intégrité de la membrane plasmique de la bactérie cible a été testée. Ensuite, différentes approches ont été retenues pour déterminer les différents mécanismes d'action : la mesure des fluidités membranaires, la mesure des perturbations des deux composantes $\Delta\Psi$ et ΔpH de la force proto-motrice de la membrane et la détection des composés sécrétés. Enfin, une approche de mesures topologiques a été réalisée par microscopie de force atomique afin de visualiser l'impact du traitement par Cbn BM1 sur la morphologie de *C. maltaromaticum* DSM20730 traité à différents états physiologiques.

III.3.1.1. Activité antibactérienne de Cbn BM1

Pour l'ensemble de cette étude, la concentration utilisée en bactériocine est de 2,5 mg.L⁻¹, concentration à laquelle une inhibition de la croissance de *C. maltaromaticum* DSM20730 est observable par mesure de densité optique à 660 nm (**Figure 25**). Afin d'étudier l'impact de l'état physiologique de la souche cible sur les mécanismes d'action de Cbn BM1, les bactéries ont été prélevées soit en début de phase exponentielle de croissance (point A), soit en début de phase stationnaire de croissance (point B).

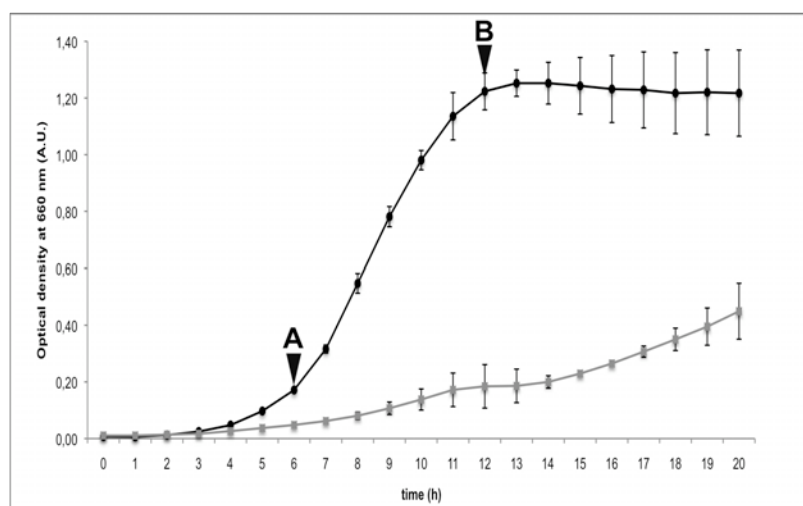


Figure 25. Croissance de *Carnobacterium maltaromaticum* DSM20730 en milieu TSB-YE à 30°C en absence (courbe noire) ou en présence de 2,5 mg.L⁻¹ de Cbn BM1 (courbe grise).

III.3.1.2. Impact de Cbn BM1 sur l'intégrité membranaire

L'activité antibactérienne des bactériocines de classe IIa repose sur leur capacité à perturber les membranes bactériennes. La première étape de caractérisation des mécanismes d'action de Cbn BM1 a donc été la mise en évidence de l'atteinte de l'intégrité physique de la membrane de *C. maltaromaticum* DSM20730. Pour cela, les bactéries, prélevées à deux états physiologiques distincts, ont été traitées par Cbn BM1 puis l'intégrité physique de leur membrane a été vérifiée par marquage fluorescent. Les sondes utilisées ont permis de déterminer le ratio entre les bactéries présentant une membrane intacte et celles présentant des dommages (Figure 26).

Il apparaît que Cbn BM1 induit une nette augmentation de la proportion de bactéries présentant une atteinte de l'intégrité physique de leur membrane. Ainsi, en absence de la bactériocine, environ 3% de la population bactérienne présente des dommages membranaires. Cette proportion augmente à une valeur d'environ 34% en présence de 2,5 mg.L⁻¹ de Cbn BM1 pour des bactéries traitées en phase exponentielle de croissance. En revanche, pour des bactéries traitées en phase stationnaire de croissance, le traitement par Cbn BM1 n'induit pas d'augmentation du pourcentage de bactéries présentant une membrane endommagée, avec une valeur moyenne d'environ 9% pour le témoin et l'essai.

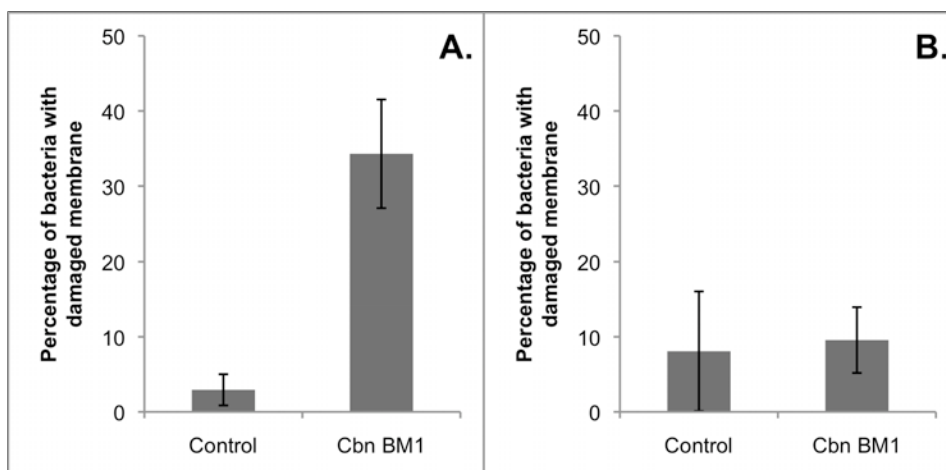


Figure 26. Pourcentage de *Carnobacterium maltaromaticum* DSM20730 présentant une atteinte de l'intégrité de leur membrane plasmique en absence (control) ou en présence de 2,5 mg.L⁻¹ de Cbn BM1 (Cbn BM1). Les bactéries ont été traitées soit en phase de croissance exponentielle (panneau A) ou en phase stationnaire (panneau B).

Cette première étape de caractérisation des mécanismes d'action de Cbn BM1 semble indiquer que *C. maltaromaticum* DSM20730 serait insensible à un traitement de 60 minutes à 2,5 mg.L⁻¹ de Cbn BM1 lorsqu'elle est en phase stationnaire de croissance. Afin de déterminer si cette insensibilité est également observable à forte concentration en Cbn BM1, les bactéries en phase stationnaire ont été traitées avec 25 mg.L⁻¹ de Cbn BM1 (Figure 27).

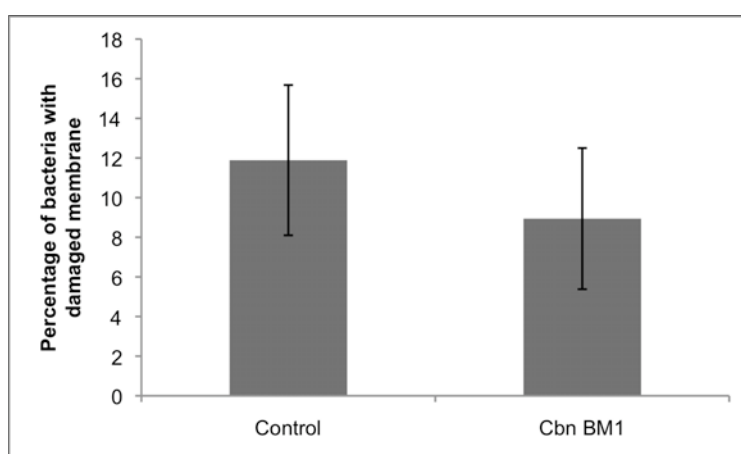


Figure 27. Pourcentage de *Carnobacterium maltaromaticum* DSM20730 en phase stationnaire de croissance présentant une atteinte de l'intégrité de leur membrane plasmique après un traitement par Cbn BM1 (25 mg.L⁻¹).

Un traitement à forte concentration en Cbn BM1 n'induit pas d'atteinte de la membrane de *C. maltaromaticum* DSM20730, indiquant ainsi la mise en place d'une résistance, ou d'une insensibilité, lors de l'entrée en phase stationnaire de croissance.

III.3.1.3. Visualisation à haute résolution de bactéries traitées par Cbn BM1

Afin d'observer à haute résolution la morphologie de *C. maltaromaticum* DSM20730, une approche de microscopie de force atomique a été entreprise. Cette technique permet l'observation *in vivo* et à une échelle nanométrique les effets d'un traitement par Cbn BM1.

Les images de déflexion ainsi obtenues ont permis de visualiser *C. maltaromaticum* DSM20730 en phase exponentielle de croissance, traitée ou non par Cbn BM1 (**Figure 28**). Les bactéries non traitées présentent une forme régulière de bâtonnet ainsi qu'une surface relativement lisse (**Figure 28.A.1**). Lorsque *C. maltaromaticum* DSM20730 est traitée par Cbn BM1 (**Figure 28.A.2**), les bactéries présentent de fortes atteintes morphologiques, avec un grand nombre de protrusions à leur surface. Ces vésicules ne présentent pas de formes ni de tailles clairement définies.

La visualisation par microscopie de force atomique de *C. maltaromaticum* DSM20730 ayant subi le même traitement par Cbn BM1, mais cette fois en phase exponentielle de croissance, a été réalisée (**Figure 29**).

Les bactéries en phase stationnaire de croissance n'ayant pas subi de traitement par Cbn BM1 présentent une morphologie analogue à celle observée en phase exponentielle de croissance (**Figure 29.B.1**). Pour ces mêmes bactéries ayant subi un traitement par Cbn BM1 (**Figure 29.B.2**), aucune protrusion n'est observable. Bien que la surface des bactéries traitées semblent plus rugueuses que celles non traitées, aucun dommage majeur n'est observable comme cela l'avait été en phase exponentielle de croissance.

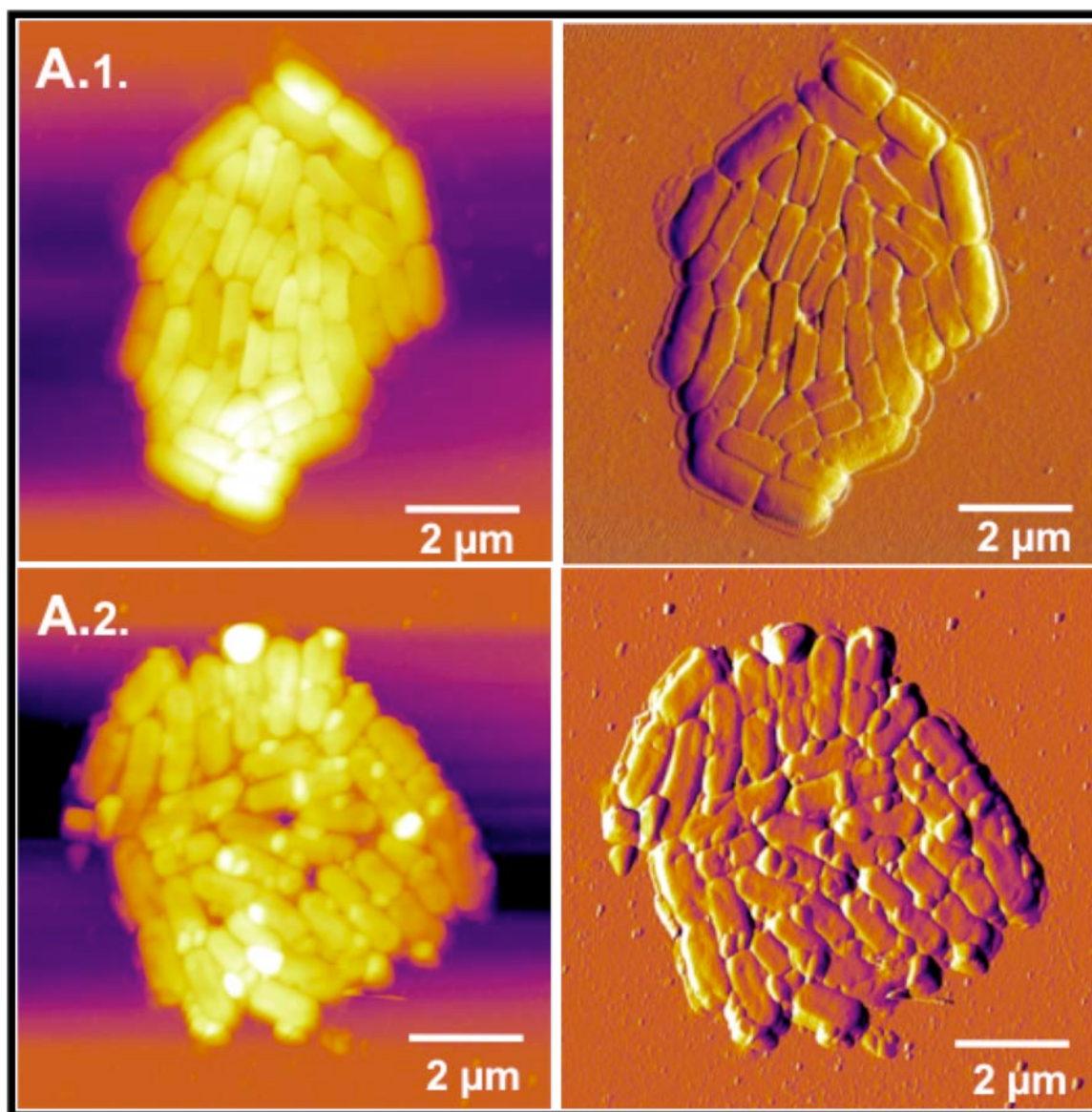


Figure 28. Imagerie par microscopie de force atomique de la hauteur (à gauche) et de la déflexion (à droite) de *Carnobacterium maltaromaticum* DSM 20730 en phase exponentielle de croissance, non traité (panneau A.1.) ou traité par Cbn BM1 (panneau A.2.).

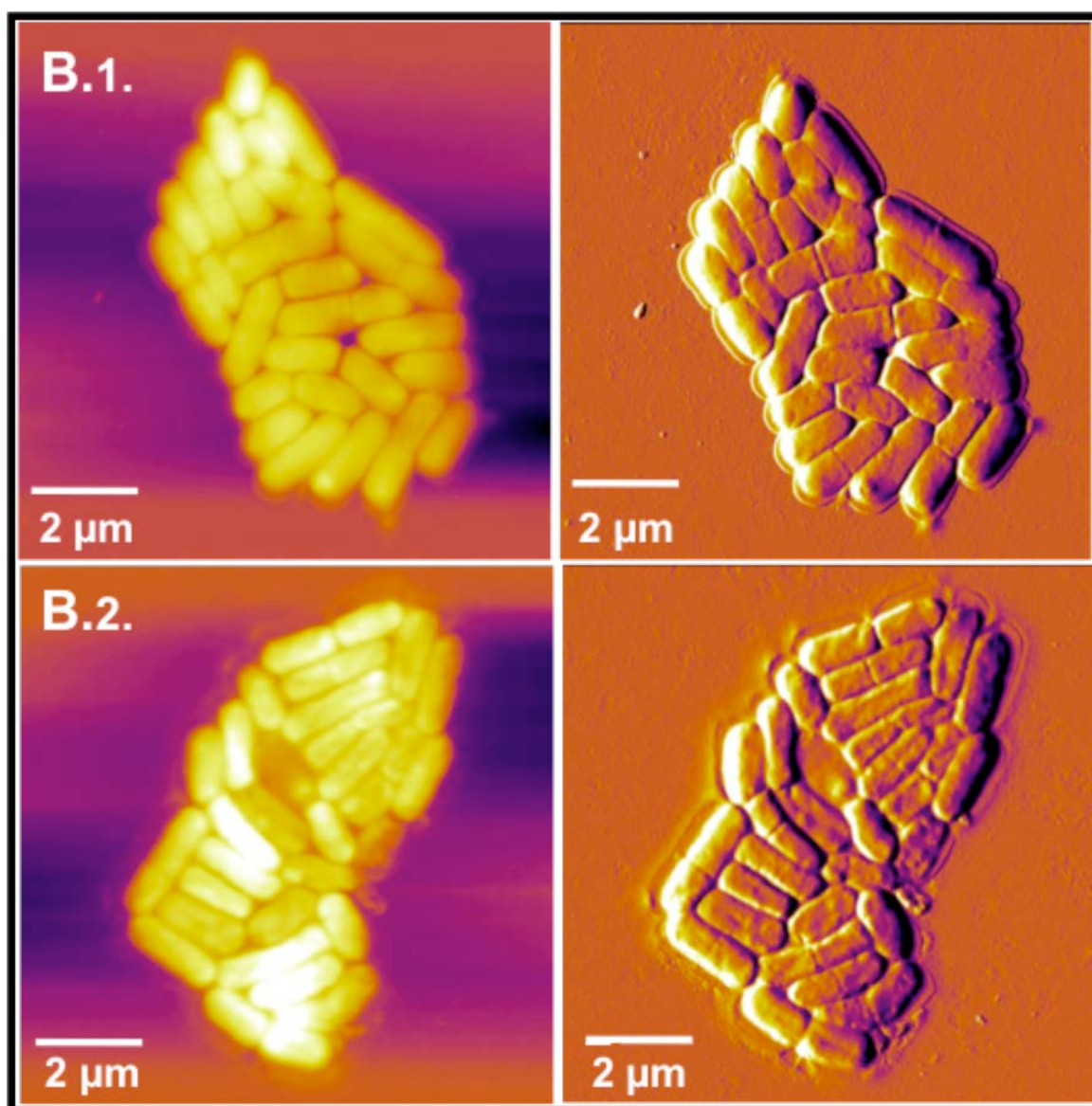


Figure 29. Imagerie par microscopie de force atomique de la hauteur (à gauche) et de la déflexion (à droite) de *Carnobacterium maltaromaticum* DSM 20730 en phase stationnaire de croissance, non traité (panneau A.1.) ou traité par Cbn BM1 (panneau A.2.).

II.3.1.4. Impact de Cbn BM1 sur la fluidité membranaire

Les effets d'un traitement de *C. maltaromaticum* DSM20730 par Cbn BM1 sur la fluidité membranaire ont été étudiés. Pour se faire, des mesures d'anisotropie de fluorescence de deux sondes spécifiques ont été réalisées. Les sondes utilisées, le DPH et le TMA-DPH, permettent respectivement d'analyser la fluidité au niveau du cœur de la bicouche lipidique et de la surface de cette dernière. La Figure 30 présente les résultats de ces mesures réalisées sur *C. maltaromaticum* DSM20730 en phase exponentielle (panneau A) ou stationnaire de croissance (panneau B), en présence ou en absence de Cbn BM1.

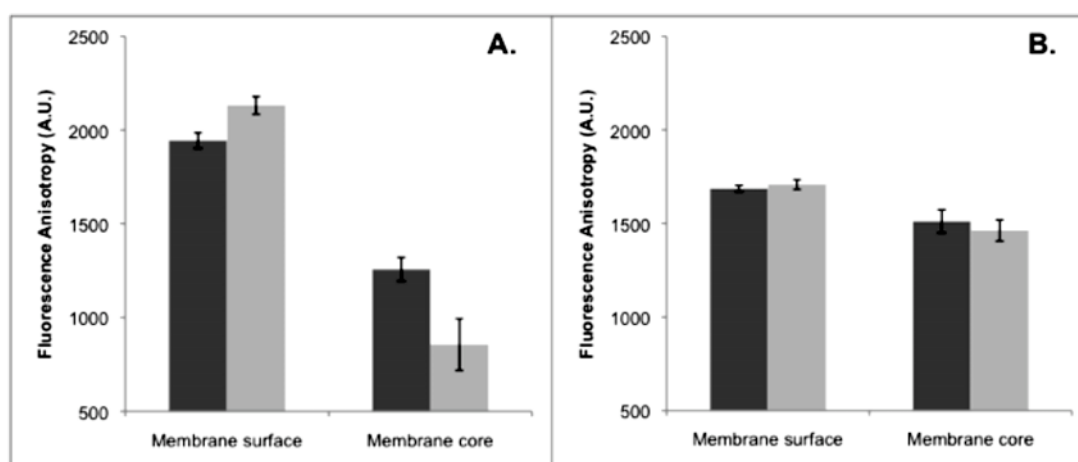


Figure 30. Fluidités membranaires de *C. maltaromaticum* DSM 20730 au niveau de la surface ("membrane surface") ou du cœur ("membrane core") de la membrane plasmique mesurées par anisotropie de fluorescence. Les mesures ont été réalisées sur les bactéries en phase exponentielle (panneau A) ou en phase stationnaire (panel B) de croissance en absence (barres sombres) ou en présence de Cbn BM1 (barres claires).

En absence de Cbn BM1, l'anisotropie de fluorescence à la surface de la membrane est plus faible en phase stationnaire de croissance (1687 U.A.) qu'en phase exponentielle de croissance (1944 U.A.). Ceci indique que la surface de la membrane est plus rigide pour les bactéries en division rapide. Concernant la valeur d'anisotropie de fluorescence pour le cœur de la bicouche lipidique, celle-ci est plus haute en phase stationnaire (1512 U.A.) qu'en phase exponentielle de croissance (1257 U.A.). Ces valeurs montrent donc que le cœur de la membrane est plus fluide pour des bactéries en division.

Suite au traitement par Cbn BM1 des bactéries en phase exponentielle de croissance, une nette augmentation de l'anisotropie du TMA-DPH est observable (de 1944 U.A. à 2141 U.A.). Ceci traduit une rigidification de la surface de la membrane suite au traitement par Cbn BM1. Parallèlement, ce même traitement conduit à une diminution de l'anisotropie de

fluorescence du DPH (de 1257 U.A. à 856 U.A.), c'est-à-dire à une fluidification du coeur de la membrane. La perturbation de l'anisotropie de fluorescence, que ce soit à la surface ou au coeur de la membrane, indique donc une interaction entre Cbn BM1 et la membrane de *C. maltaromaticum* DSM20730 en phase exponentielle de croissance.

Les valeurs d'anisotropie de fluorescence obtenues sur les bactéries en phase stationnaire de croissance demeurent inchangées après un traitement par Cbn BM1. Ceci indique que Cbn BM1 ne perturbe pas les fluidités membranaires de *C. maltaromaticum* DSM20730 en phase stationnaire de croissance, suggérant ainsi l'absence d'interaction entre le peptide et la membrane.

III.3.1.5. Impact de Cbn BM1 sur la force protomotrice membranaire

La force protomotrice membranaire est composée de deux potentiels : le potentiel $\Delta\psi$ et le potentiel ΔpH . Le potentiel $\Delta\psi$ est dû au gradient transmembranaire en ions Na^+ et K^+ . Le potentiel ΔpH est quant à lui dû au gradient transmembranaire en ions H^+ . La perturbation de ces deux potentiels peut être suivie à l'aide de sondes fluorescentes spécifiques : le DiSC₃(5) pour le gradient $\Delta\psi$ et le BCECF pour le ΔpH . La mesure de ces potentiels par fluorescence a été réalisée sur *C. maltaromaticum* DSM20730 en phase exponentielle (panneau A) ou stationnaire de croissance (panneau B) en présence, ou non, de Cbn BM1 (Figure 31).

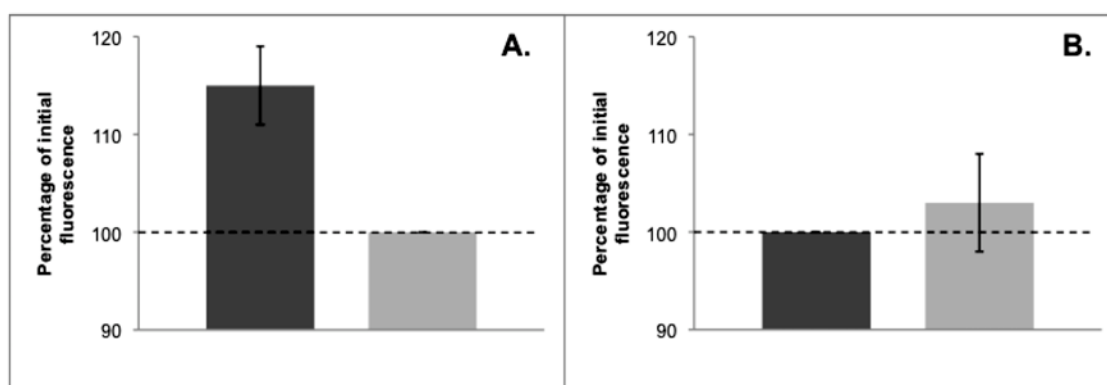


Figure 31. Variations de l'émission de fluorescence du DiSC₃(5) (barres sombres) et du BCECF (barres claires) après un traitement de *Carnobacterium maltaromaticum* DSM20730 par CbnBM1 en phase exponentielle (panneau A) ou stationnaire de croissance (panneau B). Les résultats sont exprimés en pourcentage de la fluorescence initiale (normalisée à 100).

Une augmentation de la fluorescence du DiSC₃(5) est observable suite au traitement par Cbn BM1 de *C. maltaromaticum* DSM 20730 en phase exponentielle de croissance. Par

contre, aucune variation n'est visible lorsque les bactéries en phase stationnaire de croissance. Ces résultats indiquent que le potentiel $\Delta\psi$ de la membrane de *C. maltaromaticum* DSM 20730 est perturbé par Cbn BM1, uniquement lorsque les cellules bactériennes sont en phase exponentielle de croissance.

Concernant le potentiel ΔpH , suivi par la fluorescence du BCECF, aucune variation n'est observable et ce, quelle que soit la phase de croissance. Cbn BM1 ne perturbe donc pas le potentiel ΔpH de *C. maltaromaticum* DSM 20730.

III.3.1.6. Impact de Cbn BM1 sur la sécrétion des protéines

La sécrétion de protéines est un processus fortement lié à la force protomotrice des membranes (du Plessis *et al.*, 2011 ; Natale *et al.*, 2008). Cbn BM1 entraînant la perturbation du potentiel $\Delta\psi$ de la force protomotrice, la sécrétion de protéines a été étudiée par mesure d'infrarouge à transformée de Fourier en se focalisant sur la bande amide I comme signature des protéines (Carbonaro et Nucara, 2009) (Figure 32).

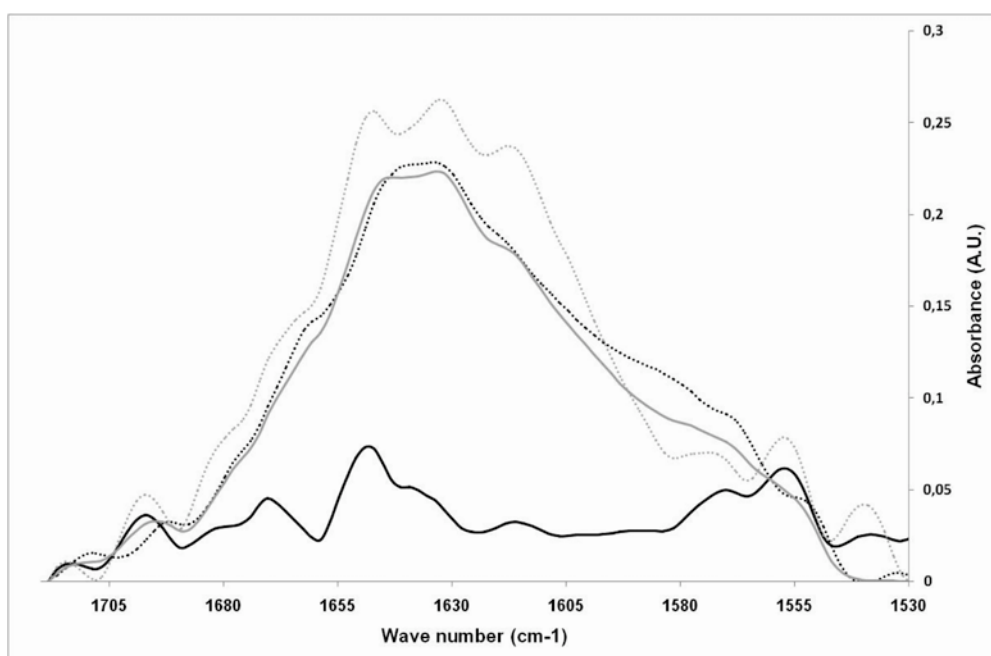


Figure 32. Spectres infrarouge à transformée de Fourier (I.R.T.F.) de surnageants de *Carnobacterium maltaromaticum* DSM20730. Les mesures d'I.R.T.F. ont été réalisées sur des bactéries en phase exponentielle (courbes noire) ou stationnaire de croissance (courbes grise) après un traitement par Cbn BM1 (courbes continues) ou non (courbes en pointillé).

Une forte absorbance est observable pour les bactéries non traitées, quelle que soit la phase de croissance (courbes en pointillé), montrant une sécrétion de composés de nature protéique quel que soit l'état physiologique. Pour les bactéries traitées par Cbn BM1 en phase stationnaire de croissance (courbe continue grise), une forte absorbance est également observable. En revanche, le spectre correspondant aux bactéries traitées en phase exponentielle de croissance (courbe continue noire) montre une absorbance beaucoup plus faible. Ceci indique une présence moindre en protéines dans le surnageant de *C. maltaromaticum* DSM 20730 traité en phase exponentielle de croissance par Cbn BM1. Cbn BM1 conduirait donc à l'inhibition de la sécrétion de protéines chez *C. maltaromaticum* DSM 20730 en phase exponentielle de croissance.

III.3.1.7. Discussion

Les mécanismes d'action de Cbn BM1 ont été étudiés pour deux états physiologiques distincts de *C. maltaromaticum* DSM 20730 et une nette différence de sensibilité a été observée entre les bactéries en phase exponentielle et celles en phase stationnaire de croissance.

L'efficacité de Cbn BM1 à perturber l'intégrité de la membrane plasmique a été évaluée en faisant appel à des sondes fluorescentes spécifiques, une méthode utilisée habituellement pour étudier la viabilité des bactéries. Celle-ci a été par exemple utilisée pour l'étude de l'activité de la nisine (Ercolini *et al.*, 2006). Une augmentation du nombre de bactéries présentant une membrane endommagée a été observée uniquement quand le traitement par Cbn BM1 a été réalisé sur des bactéries en phase exponentielle de croissance. L'augmentation de la concentration en Cbn BM1, de 2,5 mg.L⁻¹ à 25 mg.L⁻¹, n'a pas permis d'observer des dommages de la membrane plasmique chez les bactéries traitées en phase stationnaire de croissance. Ceci montre donc qu'il y a mise en place d'une résistance, sinon d'une insensibilité, liée aux changements physiologiques accompagnant la croissance de *C. maltaromaticum* DSM 20730.

Afin de confirmer la différence d'activité de Cbn BM1 entre les différents états physiologiques, une approche de mesures topologiques par microscopie de force atomique a été entreprise. Ce type d'approche permet d'éviter de faire appel à différents traitements

physiques ou chimiques pouvant potentiellement endommager la surface des bactéries. Des images à haute résolution de bactéries vivantes ont pu ainsi être obtenues et ont été utilisées pour obtenir des détails nanométriques de surfaces bactériennes traitées par des composés antibactériens. Peut être citée en exemple l'observation de l'activité de la lysostaphine sur *Staphylococcus aureus* conduisant à des changements morphologiques et à la formation de perforations de la paroi (Francius *et al.*, 2008). De même, Liu *et al.* (2011) ont montré que la lactoferricine B, un peptide issu de la lactoferrine B, induit la formation de dommages à la surface d'*Escherichia coli* et de *S. aureus*. La microscopie de force atomique permet d'observer à haute résolution l'impact d'une bactériocine de classe IIa sur la morphologie des bactéries traitées. Cette approche montre que Cbn BM1 peut causer des dommages importants à *C. maltaromaticum* DSM 20730 mais uniquement sur les bactéries en phase exponentielle de croissance. En phase stationnaire de croissance, de petits changements de texture de la surface bactérienne sont visibles mais aucun dommage majeur n'est observable. Cette augmentation de rugosité pourrait résulter de l'interaction de Cbn BM1 avec le peptidoglycane de *C. maltaromaticum* DSM 20730 sans que celle-ci conduise à une activité ciblant la membrane et conduisant à une atteinte de l'intégrité morphologique de la membrane.

Il est important de noter que toutes les bactéries en phase exponentielle de croissance ne présentent pas de dommages au niveau de leur morphologie. Cette hétérogénéité au sein de la population pourrait expliquer l'observation d'une croissance bactérienne après la bactériostase (Jasniewski *et al.*, 2008). Bien que cette reprise de croissance soit habituellement interprétée comme la fin de l'activité antibactérienne de la bactériocine, les résultats de microscopie de force atomique suggèrent que cette reprise de croissance corresponde au développement d'une fraction de la population bactérienne présentant une résistance, ou du moins une insensibilité, à la bactériocine. De nombreuses hypothèses pourraient alors être formulées pour donner une explication à cette résistance. L'existence de variants présentant des propriétés physico-chimiques de surface différentes peut être une hypothèse, de même que l'existence de concentrations locales en Cbn BM1 sub-inhibitrices.

La perturbation de la fluidité membranaire et de la composante $\Delta\psi$ de la force protomotrice de la membrane par Cbn BM1 apparaît également comme étant dépendante de l'état physiologique de *C. maltaromaticum* DSM 20730, et n'est détectée que chez les bactéries en phase exponentielle de croissance.

La perturbation de l'anisotropie de fluorescence des sondes DPH et TMA-DPH des bactéries en phase exponentielle de croissance montre une interaction entre Cbn BM1 et la membrane. De plus, cette perturbation est corrélée à la modification de la composante $\Delta\psi$. Ainsi, quand les bactéries sont en phase stationnaire de croissance, les mesures d'anisotropie de fluorescence indiquent que Cbn BM1 n'interagit pas avec la surface ou le coeur hydrophobe de la membrane plasmique, et aucune perturbation du $\Delta\psi$ n'est observable.

L'absence d'interaction entre Cbn BM1 et la surface de la membrane est similaire à ce qui est observable avec certaines souches de *Leuconostoc* résistantes à la mésentérocline 52A, une autre bactériocine de classe IIa (Jasniewski *et al.*, 2008). Ces phénomènes pourraient être liés à une différence de fluidité membranaire entre la phase exponentielle et la phase stationnaire de croissance. En effet, la composition lipidique et la fluidité membranaire dépend de l'état physiologique des bactéries (Denich *et al.*, 2003). Le coeur de la membrane de *C. maltaromaticum* DSM 20730 est plus rigide en phase stationnaire de croissance et la surface plus fluide, ce qui suggère une modification de la composition membranaire. La fluidité est liée à la composition en phospholipides. Le mécanisme le plus commun pour moduler la fluidité membranaire est le changement de ratio entre les acides gras saturés et insaturés (Denich *et al.*, 2003), un paramètre qui peut également moduler la sensibilité aux bactériocines (Limonet *et al.*, 2002 ; Vadyvaloo *et al.*, 2002).

Les perturbations du $\Delta\psi$ pourraient être liées aux modifications de morphologie observées par microscopie de force atomique. Strahl et Hamoen (2010) ont montré que ce potentiel membranaire est crucial pour assurer une localisation correcte de différentes protéines impliquées dans la morphogénèse de différentes espèces bactériennes et module la distribution de nombreuses protéines impliquées dans la division telles que MinD, PtsA et MreD. L'activité de la nisine conduit à la délocalisation de MinD, PtsA et de MreB et conduit à la formation de bactéries allongées ou présentant une taille très réduite, traduisant un dysfonctionnement du système Min.

Différentes études ont montré que la sécrétion de protéines, et notamment via les systèmes Sec ou Tat, est également dépendante de la force protomotrice membranaire (Du Plessis *et al.*, 2011 ; Natale *et al.*, 2008). La présence de protéine dans des surnageants de *C. maltaromaticum* DSM 20730 a été étudiée par infrarouge à transformée de Fourier. Cette approche a révélé une quantité très amoindrie de protéines dans le surnageant bactérien après un traitement par Cbn BM1. Il apparaît donc probable que le traitement par Cbn BM1, via

l'altération de la force protomotrice, conduit à un dysfonctionnement des systèmes de sécrétion chez *C. maltaromaticum* DSM 20730.

Cette étude a été rédigée sous forme d'une publication actuellement soumise dans "Research in Microbiology".

III.3.2. Mécanismes d'action de Cbn BM1 sur *L. monocytogenes* EGDe

Les mécanismes d'action de Cbn BM1 ont également été étudiés sur une autre souche bactérienne sensible à la carnobactériocine Cbn BM1, *L. monocytogenes* EGDe. Cette souche a été sélectionnée en raison de l'existence du mutant *L. monocytogenes* EGDe Δ *mptI*, n'exprimant plus la mannose perméase (Vu-Khac et Miller, 2009), et qui peut servir de témoin résistant lors des essais.

Des essais de traitement par Cbn BM1 ont été réalisés sur des cellules en phase exponentielle de croissance, comme réalisé pour *C. maltaromaticum* DSM20730. En effet, seules les cellules de *L. monocytogenes* EGDe dans cet état physiologique sont sensibles à l'action de Cbn BM1. Par conséquent, seulement les résultats obtenus sur les bactéries en phase exponentielle de croissance sont présentés ici.

III.3.2.1. Activité antibactérienne de Cbn BM1 sur *L. monocytogenes* EGDe et *L. monocytogenes* EGDe Δ *mptI*

De même que pour l'étude des mécanismes d'action de Cbn BM1 sur *C. maltaromaticum* DSM20730, la concentration en Cbn BM1 utilisée est de 2,5 mg.L⁻¹, concentration à laquelle une inhibition de croissance de *L. monocytogenes* EGDe est observable (Figure 33.A.).

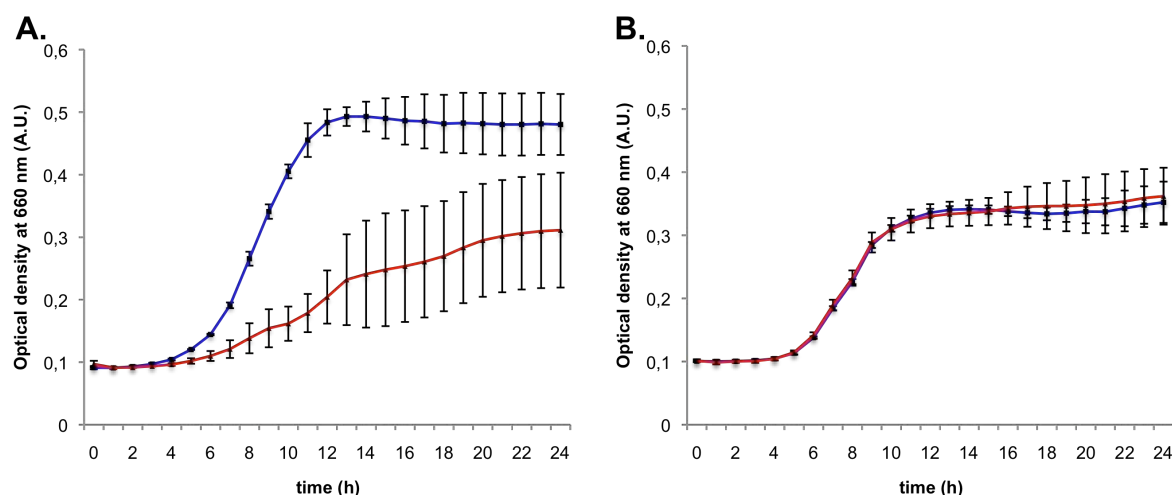


Figure 33. Croissance de *L. monocytogenes* EGDe (panneau A) et de *L. monocytogenes* EGDe Δ *mptI* (panneau B) en milieu TSB-YE à 37°C en absence (courbe bleue) ou en présence de 2,5 mg.L⁻¹ de Cbn BM1 (courbe rouge).

La souche *L. monocytogenes* EGDe Δ *mptI*, qui n'exprime pas la mannose perméase, ne présente pas d'inhibition de croissance par Cbn BM1 (Figure 33.B.), ce qui était attendu.

III.3.2.2. Interaction entre Cbn BM1 et la membrane plasmique

La fluidité membranaire a été étudiée par mesure d'anisotropie de fluorescence du TMA-DPH et du DPH (Figure 34). La sonde fluorescente TMA-DPH est utilisée pour étudier l'interaction de Cbn BM1 avec la surface de la membrane (surface) et la sonde DPH pour évaluer l'éventuelle pénétration du peptide au sein de la bicouche lipidique (core).

Le traitement par Cbn BM1 ($2,5 \text{ mg.L}^{-1}$) induit une augmentation de la valeur d'anisotropie de fluorescence du TMA-DPH d'environ 226 U.A. pour *L. monocytogenes* EGDe. En revanche, aucun changement de l'anisotropie de fluorescence de cette sonde n'est observable pour *L. monocytogenes* EGDe $\Delta mptI$. En utilisant comme sonde fluorescente le DPH, aucune modification de l'anisotropie par Cbn BM1 n'est observée quelle que soit la souche bactérienne.

Ces résultats indiquent donc que, pour *L. monocytogenes* EGDe, Cbn BM1 ne pénètre pas au sein de la bicouche lipidique mais interagit seulement avec la surface de la membrane plasmique, entraînant sa rigidification. L'absence d'une telle interaction chez le mutant $\Delta mptI$ indique que la mannose perméase est indispensable, directement ou non, à l'interaction entre la surface et le coeur de la membrane plasmique de *L. monocytogenes* EGDE et Cbn BM1.

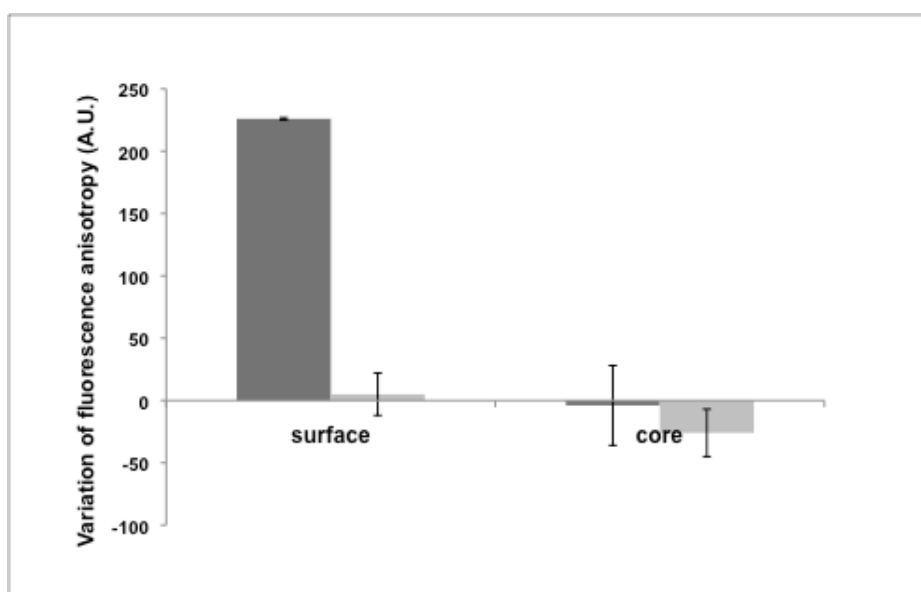


Figure 34. Variations de la fluidité de surface et du coeur de la membrane de *L. monocytogenes* EGDe (en gris foncé) et de *L. monocytogenes* EGDe $\Delta mptI$ (en gris clair) mesurées par anisotropie de fluorescence des sondes TMA-DPH et DPH, respectivement. Les mesures ont été réalisées après 60 minutes de traitement par Cbn BM1 ($2,5 \text{ mg.L}^{-1}$).

III.3.2.3. Impact de Cbn BM1 sur l'intégrité membranaire

L'intégrité des membranes de *L. monocytogenes* EGDE et de *L. monocytogenes* EGDe Δ *mptI* suite à un traitement par Cbn BM1 (2,5 mg.L⁻¹) a été déterminée par numération des bactéries marquées par deux sondes fluorescentes spécifiques: l'iodure de propidium et le Syto9® (Berney *et al.*, 2007). Cette numération a permis de déterminer le ratio entre les bactéries présentant une membrane intacte et celle présentant des dommages de la membrane (Figure 35).

Le pourcentage de bactéries avec une membrane endommagée en absence de Cbn BM1 est d'environ 3% pour *L. monocytogenes* EGDe et son mutant. Une augmentation de cette proportion à environ 67% ($\pm$ 22%) est observable après le traitement de *L. monocytogenes* EGDe par Cbn BM1. Par contre, aucune augmentation de cette proportion n'est observée pour *L. monocytogenes* EGDe Δ *mptI*. La présence de la mannose perméase est donc indispensable pour observer une atteinte de l'intégrité membranaire de *L. monocytogenes* EGDe en phase exponentielle de croissance.

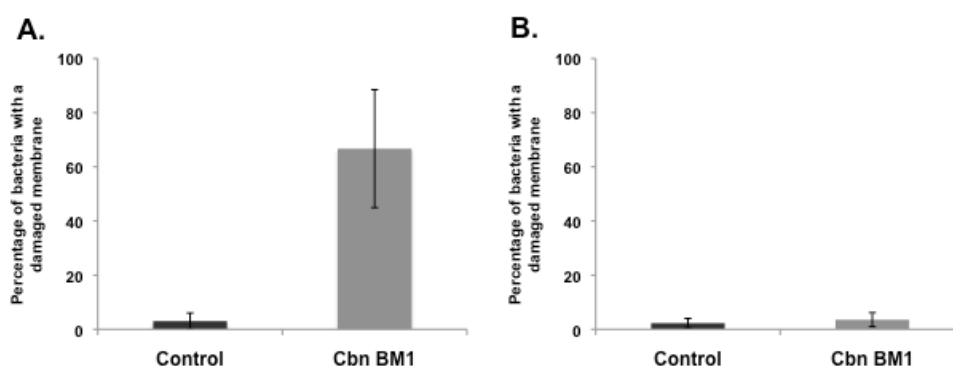


Figure 35. Pourcentage de la population de *Listeria monocytogenes* EGDe (A) et de *Listeria monocytogenes* EGDe Δ *mptI* (B) présentant une membrane endommagée suite à un traitement par Cbn BM1 (2.5 mg.L⁻¹) en phase exponentielle de croissance.

III.3.2.4. Visualisation à haute résolution de *Listeria monocytogenes* EGDe

Les conséquences morphologiques du traitement de *Listeria monocytogenes* EGDe par Cbn BM1 ont été visualisées par des mesures topologiques en microscopie de force atomique (Figure 36).

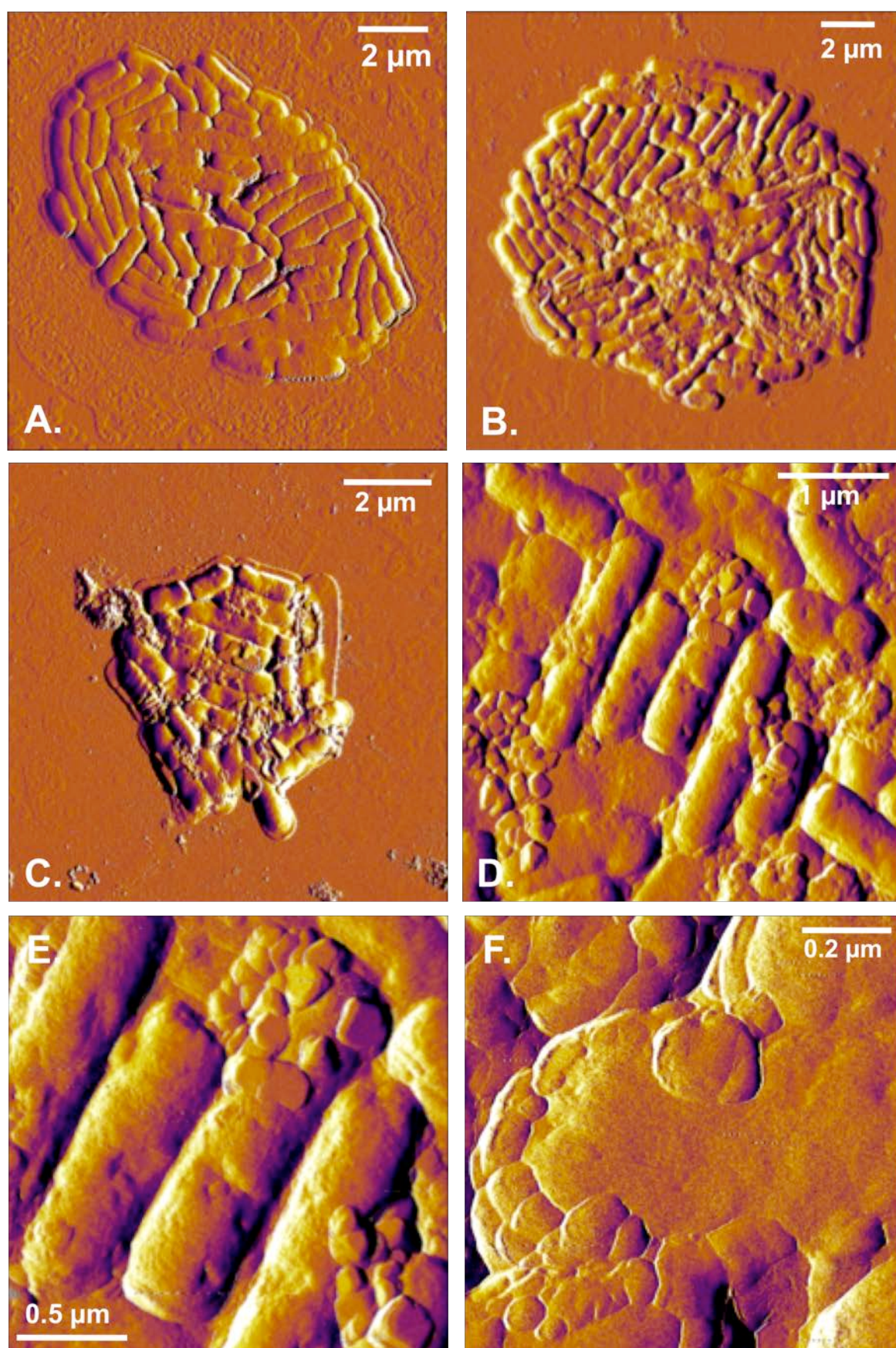


Figure 36. Visualisation par microscopie de force atomique de *Listeria monocytogenes* EGDe non traitée (panneau A) ou traitée par Cbn BM1 (panneaux B à F).

Les bactéries non traitées (panneau A) présentent une surface lisse et homogène et ne présentent aucun dommages apparents. Les bactéries ayant été traitées par Cbn BM1 (panneaux B à F) montrent de nombreux dommages au niveau de leurs surfaces. Ceux-ci prennent la forme de nombreuses protrusions de tailles et de formes diverses. Il est à noter que l'ensemble des bactéries traitées ne présentent pas le même degré d'atteinte de leur morphologie et certaines d'entre elles ne présentent pas ou très peu de dommages.

III.3.2.5. Discussion

Les bactériocines de classe IIa sont définies comme des peptides antibactériens actifs contre les bactéries du genre *Listeria*. Leur mécanisme d'action repose sur le ciblage des membranes plasmiques avec pénétration, ou non, au cœur de celles-ci. L'interaction de Cbn BM1 avec uniquement la surface de la membrane a été montrée au sein de cette étude par des mesures d'anisotropie de fluorescence de sondes spécifiques. L'absence de pénétration au sein de la bicouche lipidique semble donc indiquer que le mécanisme d'action de Cbn BM1 sur *Listeria monocytogenes* EGDe correspond au modèle dit "carpet model" (Brogden, 2005). Dans ce modèle, les bactériocines demeureraient au contact des têtes polaires des phospholipides durant la perméabilisation de la membrane et formeraient ainsi un tapis à la surface de celle-ci. A partir d'une concentration locale suffisante, il y aurait alors formation de pores sans que les bactériocines ne pénètrent au sein de la bicouche lipidique (Shai, 1999). Cette même approche a été réalisée sur *Listeria monocytogenes* EGDe Δ mptI, un mutant délété pour la mannose perméase de type II (Vu-Khac et Miller, 2009). Aucune interaction avec la surface de la membrane n'a pu être montrée par anisotropie de fluorescence.

Ceci confirmerait donc le rôle de la mannose perméase de type II comme récepteur des bactériocines de classe IIa chez *L. monocytogenes* (Kjos *et al.*, 2009), bien que les méthodes utilisées dans l'étude présentée ici ne montre pas l'interaction directe entre le peptide et la mannose perméase (Kjos *et al.*, 2010). Il est toutefois à noter que des mutants de *L. monocytogenes* résistants à la sakacine P, une autre bactériocine de classe IIa, montrent une augmentation de l'expression de la mannose perméase (Tessema *et al.*, 2009).

Un tel mécanisme d'action suggère donc une atteinte de l'intégrité physique de la membrane. C'est pourquoi une approche faisant appel à des sondes fluorescentes spécifiques de cette intégrité a été entreprise. Ceci a permis de montrer que Cbn BM1 induit une forte augmentation de la proportion de bactéries ayant une membrane endommagée. Cette approche

a également permis de mettre en avant que l'ensemble des bactéries au sein de la population ne montrait pas de dommages membranaires, du moins observables avec la méthode utilisée. Cette hétérogénéité suite à un traitement par Cbn BM1 pourrait expliquer l'observation d'une reprise de croissance observable après une bactériostase (Jasniewski *et al.*, 2008). Cette méthode permet donc d'apporter une vue plus précise du mode d'action de la bactériocine notamment au niveau d'une population bactérienne, ce qui ne peut pas être réalisé avec des approches plus "classiques".

Afin d'aller plus loin dans la visualisation *in vivo* de l'impact morphologique de l'activité de Cbn BM1, des mesures de topologie de *L. monocytogenes* EGDe par microscopie de force atomique ont été réalisées. Cette approche a alors permis pour la première fois de visualiser *in vivo* et à une échelle nanométrique l'action d'une bactériocine de classe IIa sur *Listeria monocytogenes*. Les images ainsi obtenues ont révélé des dommages majeurs et une atteinte de l'intégrité morphologique des bactéries traitées. Conformément aux essais portant sur l'intégrité membranaire, les images obtenues confirment l'hétérogénéité de réponse de la population suite à un traitement par Cbn BM1.

Cette étude a été rédigée sous forme d'une publication actuellement soumise dans "Journal of Dairy Science".

IV. Impact d'un traitement par Cbn BM1 sur les propriétés nano-mécaniques de *C. maltaromaticum*

IV.1. Introduction

La détermination des propriétés de surface au niveau d'une population a démontré la nécessité de travailler au niveau d'une cellule afin d'étudier les mécanismes d'action de Cbn BM1. Une approche de microscopie de force atomique en mode "force" a été retenue. Cette approche permet de déterminer les propriétés nano-mécaniques des bactéries et l'impact que pourrait avoir un traitement avec une bactériocine de classe IIa sur ces propriétés.

Suite aux travaux présentés précédemment, l'impact de l'activité de la carnobactériocine Cbn BM1 sur les propriétés nano-mécaniques de *C. maltaromaticum* DSM20730 a été étudié uniquement sur des cellules en phase exponentielle de croissance, lorsqu'elles présentent une sensibilité à Cbn BM1.

Les résultats présentés ci-dessous résultent d'une mise au point technique délicate et demeurent préliminaires.

IV.2. Etude

IV.2.1. Immobilisation des bactéries sur support

Les mesures de forces nanomécaniques nécessitent dans un premier temps d'immobiliser les bactéries sur un support qui est, dans notre cas, une lame de verre. Contrairement aux mesures topologiques qui peuvent être réalisées sur des bactéries fixées par séchage, les mesures de force doivent nécessairement être réalisées en milieu liquide. Il a donc été nécessaire de trouver une technique d'immobilisation efficace des bactéries. Les différentes méthodes d'immobilisation existantes sont présentées dans le Tableau 13.

Parmi celles-ci, plusieurs ont été testées dans le but d'immobiliser *C. maltaromaticum* DSM20730. Les techniques entraînant des modifications chimiques des surfaces bactériennes ont été exclues afin d'éviter tout mécanisme d'action artefactuel de la bactériocine avec une surface bactérienne changée et, par conséquent, non physiologique.

Les premiers essais ont été réalisés avec des filtres en polycarbonates. Avec cette méthode, les bactéries sont lavées et resuspendues dans une solution de NaCl à 9 g.L⁻¹ et filtrées sur des filtres en polycarbonates (Millipore). Différents diamètres de pores ont été testés : soit 0,2 µm, soit 0,8 µm. Seuls les filtres avec des pores de 0,2 µm de diamètre sont capables de retenir *C. maltaromaticum* DSM20730. Cependant, deux inconvénients majeurs se sont opposés à la réalisation de mesure de forces sur ces échantillons. Le premier est la mauvaise orientation des bactéries enchassées dans les pores. En effet, celles enchassées dans les pores par aspiration présentaient quasiment toutes une orientation verticale inadaptée aux mesures de forces. Le second inconvénient, plus limitant encore, est la faiblesse de l'immobilisation. Aucune bactérie enchassée dans un pore n'a permis d'obtenir une image complète avant son décrochement dû à la pointe du microscope. Il apparaît donc que la morphologie de *C. maltaromaticum* ne se prête pas à son immobilisation sur filtre de polycarbonate.

Une deuxième approche a été alors entreprise consistant à immobiliser les bactéries à l'aide d'un film de gélatine (Park et Abu-Lail, 2010). Les lames sont couvertes d'une fine couche de gélatine (Sigma G6144) et la suspension bactérienne y est déposée à la surface. Après 20 minutes d'attachement, le tout est rincé délicatement et recouvert de milieu TSB-YE dilué dix fois afin de conserver les bactéries dans un état physiologique permettant une activité de la bactériocine. Cette approche n'a pas été concluante quant à sa capacité à immobiliser *C. maltaromaticum* DSM20730 en vue de réaliser des mesures nano-mécaniques.

Une autre approche a été envisagée pour l'immobilisation des bactéries : l'utilisation de protéines polyphénoliques extraites de *Mytilus edulis* (Cell-Tak™, BD Bioscience). Ces protéines sont couramment utilisées pour la fixation de cellules eucaryotes ou de tissus sur différents supports de culture. Louise Meyer *et al.* (2010) ont également utilisé ce type de protéine pour immobiliser avec succès *Staphylococcus sciuri*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* et *Mycobacterium sp.* Dans le cas de notre étude sur *C. maltaromaticum* DSM20730, les protéines polyphénoliques se sont révélées inefficaces. Cette incapacité à fixer *C. maltaromaticum* alors que Louise Meyer *et al.* ont réussi à immobiliser des bactéries peut être surprenante de prime abord. Cependant, il est à noter que ces auteurs ont travaillé avec des bactéries cultivées sur une nuit et qui peuvent donc être supposées en phase stationnaire de croissance, alors que notre étude porte sur des bactéries en phase exponentielle de croissance. Ces auteurs ont d'ailleurs remarqué que les bactéries se décrochent massivement du support après trois heures d'immobilisation et suggèrent que ce phénomène soit lié à la croissance

bactérienne. Cette hypothèse semble donc confirmée par l'incapacité à fixer *C. maltaromaticum* en phase exponentielle de croissance.

Tableau 13. Méthodes utilisées pour immobiliser les bactéries pour la microscopie de force atomique en milieu liquide (d'après Louise Meyer *et al.*, 2010). Les méthodes marquées par un astérisque ont été utilisées au cours de cette étude.

Methode	Caractéristiques	Référence
Confinement physique		
filtre polycarbonate*	Plus adapté aux cocci Gram positifs Peut causer une déformation des bactéries Pas de modifications chimiques	Turner <i>et al.</i> , 2010, Francius <i>et al.</i> , 2008, Dufrêne <i>et al.</i> , 2008
micro-puits	Applicable à des tailles de bactéries bien définies Pas de déformation des bactéries Pas de modifications chimiques	Louise Meyer <i>et al.</i> , 2010, Kailas <i>et al.</i> , 2009
Adsorption physique		
Gélatine*	Applicable toute morphologie de bactéries Pas de déformation des bactéries Pas de modifications chimiques	Park & Abu-Lail, 2010, Doktycz <i>et al.</i> , 2003
EDS APTES PEI*	Immobilisation plus faible à haute force ionique	Louise Meyer <i>et al.</i> , 2010, Louise Meyer <i>et al.</i> , 2010, Francius <i>et al.</i> , 2008, Gaboriaud <i>et al.</i> , 2008, Pelling <i>et al.</i> , 2005
Poly-L-Lysine		Louise Meyer <i>et al.</i> , 2010, Stukalov <i>et al.</i> , 2008, Vadillo-Rodriguez <i>et al.</i> , 2005, Schär-Zamaretti <i>et al.</i> , 2003.
Poly-dopamine		Kang et Elimelech, 2009
Liaison covalente		
Entre COOH et NH2	Applicable toute morphologie de bactéries	Louise Meyer <i>et al.</i> , 2010, Strauss <i>et al.</i> , 2009, Camesano <i>et al.</i> , 2000
Glutaraldéhyde	Pas de déformation des bactéries Modifications chimiques	Louise Meyer <i>et al.</i> , 2010, Sheng <i>et al.</i> , 2007, Sullivan <i>et al.</i> , 2007 Xiaoxia <i>et al.</i> , 2006, Cao <i>et al.</i> , 2006, Vadillo-Rodriguez <i>et al.</i> , 2004, Razatos <i>et al.</i> , 1998
Protéines adhésives		
Protéine polyphénolique*	Applicable toute morphologie de bactéries	Louise Meyer <i>et al.</i> , 2010,
Poly-dopamine	Pas de déformation des bactéries Pas de modifications chimiques	Kang et Elimelech, 2009
Lectines	Nécessite la présence de glucides particuliers en surface des bactéries	Gad <i>et al.</i> , 1997

Une quatrième approche a alors été utilisée. Pour ces essais l'immobilisation des bactéries a été tentée à l'aide de polyéthylèneimine (P.E.I.). Ce polymère cationique s'adsorbe spontanément au verre et a été utilisé dans différentes études pour l'immobilisation de bactéries pour des mesures de force. Différents temps de fixation du P.E.I. sur la lame de verre ont été essayés, variant de quinze à soixante minutes. De même, différentes concentration en bactéries dans l'échantillon à fixer ont été testées, variant d'une densité optique d'une valeur de 0,5 à 5. Enfin, différentes solutions de suspension des bactéries ont également été testées : NaCl 9 g.L⁻¹, tampon phosphate (50 nM, pH=6,5) et milieu de culture (non dilué, dilué deux fois ou dilué dix fois). Après de nombreux essais, un faible nombre de bactéries a pu être immobilisé sur la lame de verre. Bien que la force de l'immobilisation se soit révélée très faible et qu'une grande majorité des bactéries sont décrochées par la pointe du microscope, des mesures de force ont pu être réalisées avec une suspension de bactéries à D.O. = 1 et dans du milieu TSB-YE dilué 10 fois.

IV.2.2. Mesures de force

Les mesures réalisées ont permis de déterminer les constantes de raideur (en N/m) et les modules d'élasticité en (kPa) en différents points d'une même bactérie et sur plusieurs bactéries après calibration sur le support. Ces déterminations ont été faites avant le traitement par Cbn BM1 (indiqué par 0 min) puis à différents temps (de 0 à 220 minutes) après l'addition de la bactériocine (Figure 41 et Figure 42). La concentration en Cbn BM1 utilisée est de 10 mg.L⁻¹.

IV.2.2.1. Module d'élasticité (ou module de Young)

Le module d'élasticité (module de Young) est la constante qui relie la contrainte de compression par la pointe et la déformation de la bactérie. La zone étudiée par microscopie de force atomique est découpée en pixels et le module d'élasticité est déterminé pour chaque pixel. Une carte est ainsi obtenue et la distribution des valeurs mesurées (en pourcentage sur les graphiques présentés) peut en être déduite (Figure 37).

Cartes

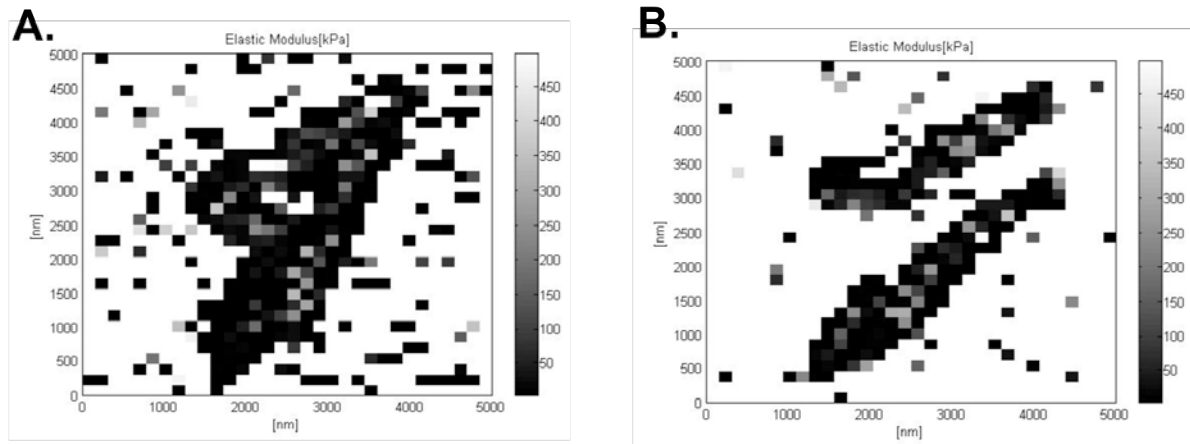


Figure 37. Cartographie des modules élastiques (kPa) de *Carnobacterium maltaromaticum* DSM20730 avant addition de Cbn BM1 (panneau A) et après une incubation de 193 minutes en présence de Cbn BM1 (10 mg.L^{-1}) (panneau B).

Distribution en fonction du temps

A partir des cartes obtenues précédemment, la distribution des modules d'élasticité mesurés peut être réalisée (Figure 38). Il est toutefois nécessaire de définir et de soustraire les pixels correspondant au support de l'échantillon.

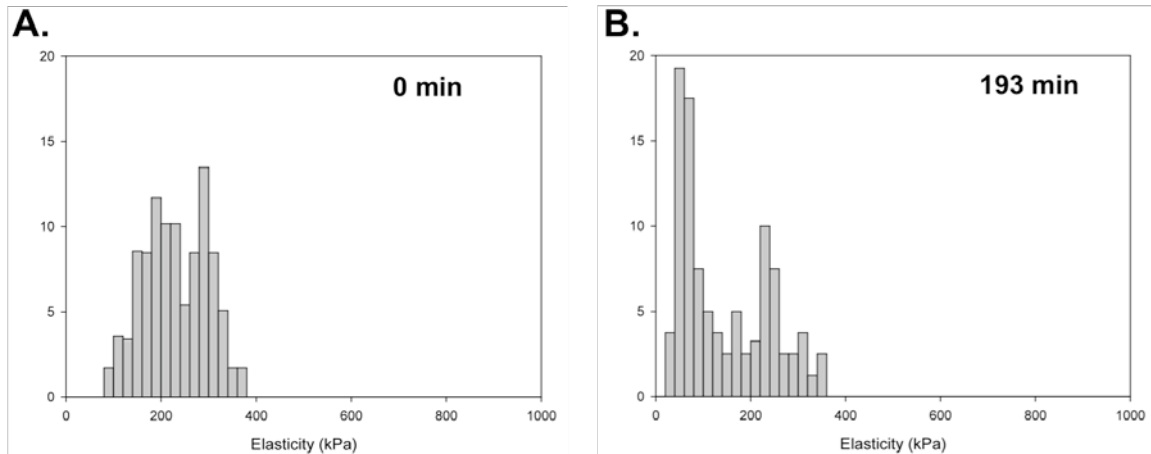


Figure 38. Distribution des modules d'élasticité (kPa) de *Carnobacterium maltaromaticum* DSM20730 avant ajout de Cbn BM1 (panneau A) et après 193 minutes d'incubation avec Cbn BM1 (10 mg.L^{-1}) (panneau B). L'ordonnée représente de pourcentage de la population des valeurs mesurées.

IV.2.2.2. Constante de raideur

La constante de raideur exprime la relation entre la force appliquée à la bactérie et sa résistance à la déformation. De même que pour le module d'élasticité, la constante de raideur est déterminée pour chaque pixel de l'échantillon. Une carte est alors obtenue (Figure 39) et la distribution des valeurs mesurées (en pourcentage sur les graphiques présentés) peut en être déduite.

Cartes

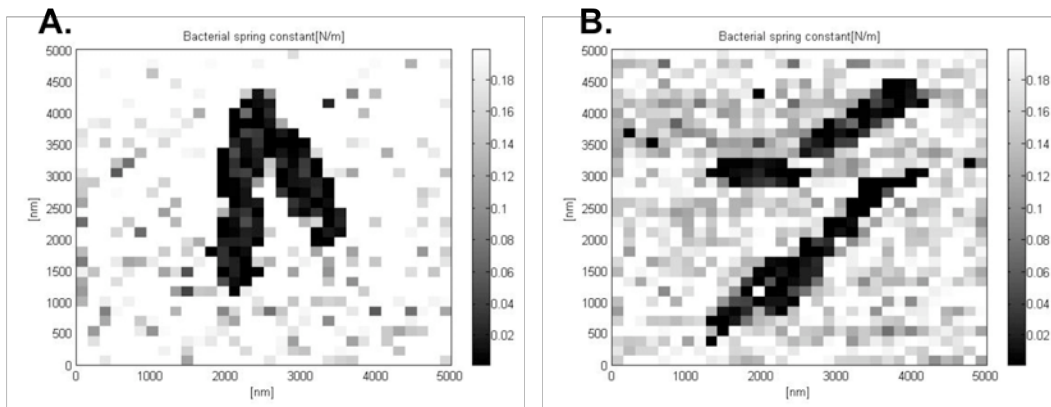


Figure 39. Cartographie des constantes de raideur (N/m) de *Carnobacterium maltaromaticum* DSM20730 avant addition de Cbn BM1 (panneau A) et après une incubation de 193 minutes en présence de Cbn BM1 (10 mg.L⁻¹) (panneau B).

Distribution en fonction du temps

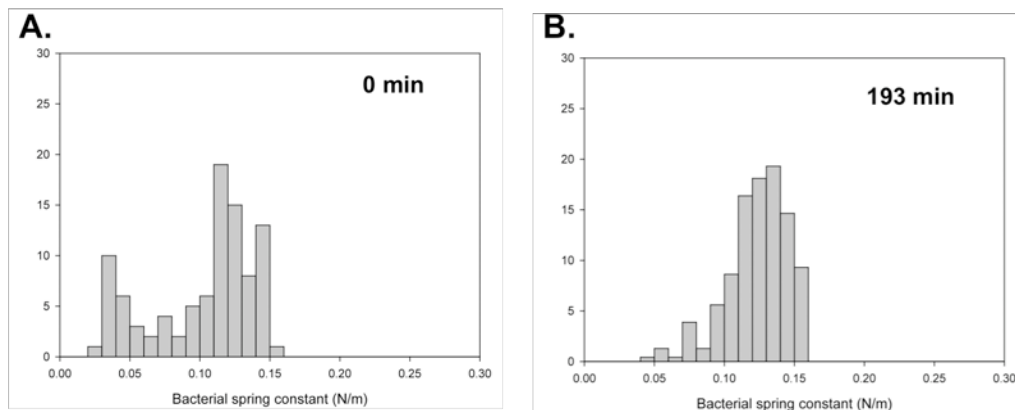


Figure 40. Distribution des constantes de raideur (N/m) de *Carnobacterium maltaromaticum* DSM20730 avant ajout de Cbn BM1 (panneau A) et après 193 minutes d'incubation avec Cbn BM1 (10 mg.L⁻¹) (panneau B). L'ordonnée représente de pourcentage de la population des valeurs mesurées.

De même que pour les constantes d'élasticité, la distribution des constantes de raideur peut être déterminée (l'ordonnée représente le pourcentage de la population) (Figure 40).

IV.2.3. Analyse des résultats des mesures de force

La distribution des valeurs obtenues avant l'addition de la bactériocine (0 min) apparaît comme étant bimodale. Il est important de noter ici cette notion renvoie à deux populations de valeurs, c'est-à-dire de pixels, et non pas de population de bactéries. Ainsi, les valeurs obtenues pour l'évolution de l'élasticité de *C. maltaromaticum* DSM20730 après l'ajout de Cbn BM1 sont présentées dans la Figure 41 où l'évolution des deux modes de distribution sont présentés (courbe bleue et courbe rouge). Une diminution de l'élasticité est donc observable quelle que soit la population de valeur observée, évoluant dans des valeurs semi-quantitatives d'environ 200 et 300 kPa avant addition de Cbn BM1 à environ 50 et 200 kPa après 220 minutes d'incubation.

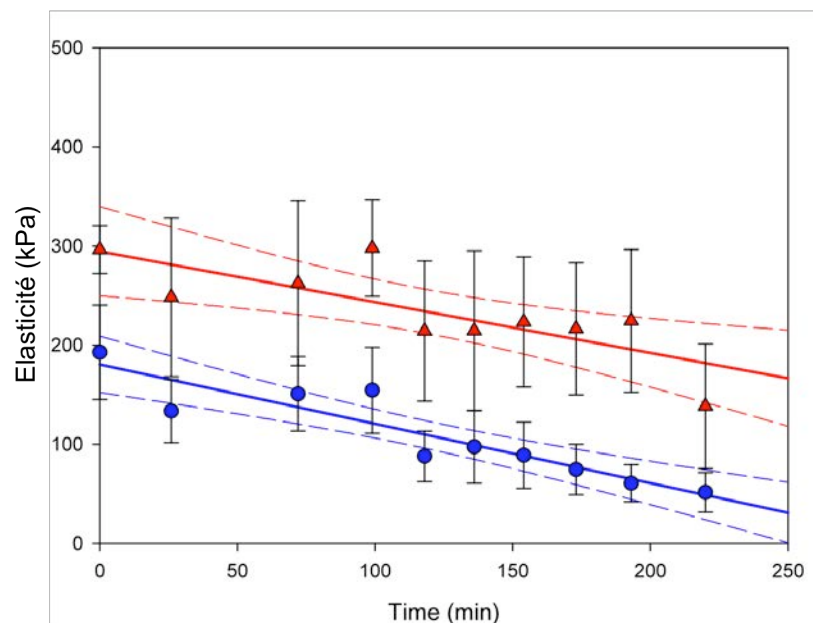


Figure 41. Evolution des valeurs d'élasticité de *Carnobacterium maltaromaticum* DSM20730 en fonction du temps en présence de Cbn BM1.

Les valeurs obtenues pour l'évolution de la raideur de *C. maltaromaticum* DSM20730 après l'ajout de Cbn BM1 sont présentées dans la Figure 42. Contrairement aux valeurs d'élasticité, les valeurs mesurées pour la raideur semble indiquer une valeur constante au

cours du temps pour la population initiale de faible raideur (en bleu) ou une très faible augmentation pour la population de valeurs de plus forte raideur initiale (en rouge).

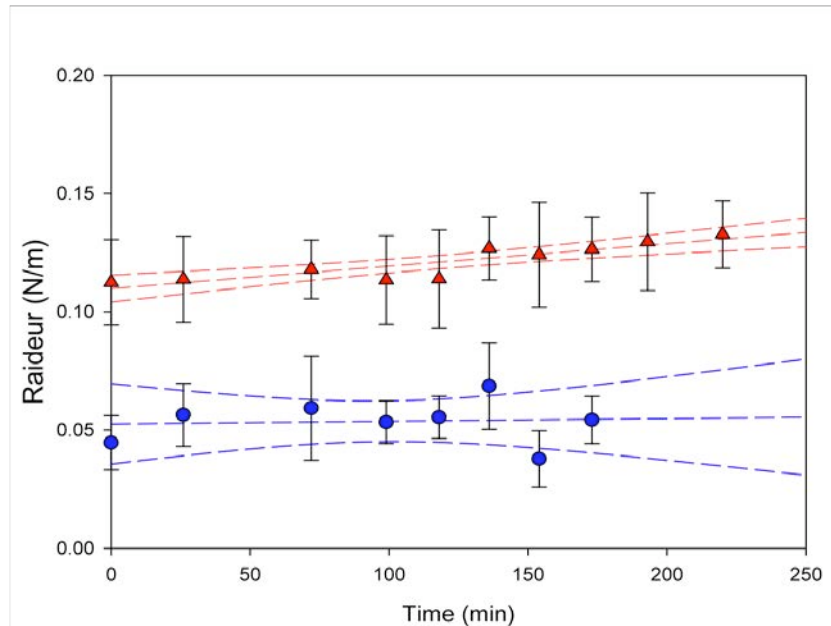


Figure 42. Evolution des valeurs de raideur de *Carnobacterium maltaromaticum* DSM20730 en fonction du temps en présence de Cbn BM1.

Ces résultats préliminaires sembleraient donc indiquer qu'un traitement par la bactériocine Cbn BM1 (10 mg.L^{-1}) affecte les propriétés nano-mécaniques de *C. maltaromaticum* DSM20730 et notamment l'élasticité alors que la raideur ne semblerait pas ou très peu affectée. Des travaux portant sur les effets de la lysostaphine sur *Staphylococcus aureus* (Francius *et al.*, 2008) ont montré une variation beaucoup plus importante des propriétés nano-mécaniques suite au traitement telle qu'une baisse d'environ 1500 kPa en ce qui concerne le module d'élasticité. Ceci pourrait être dû à la cible même du composé antibactérien. En effet, la cible de la lysostaphine est le peptidoglycane et il apparaît plausible que son atteinte puisse avoir de plus grande conséquences sur les propriétés nano-mécaniques que Cbn BM1 dont l'activité cible la membrane bactérienne.

Ces résultats seront toutefois à comparer à ceux obtenus pour des bactéries non traitées afin de s'assurer qu'il ne s'agit pas de la simple évolution "naturelle" des propriétés de la souche sur la durée d'observation dans les conditions retenues. En raison des difficultés rencontrées concernant la fixation des bactéries, ces mesures n'ont pu être réalisées. Les écart-types obtenus confirment la nécessité de trouver des conditions d'immobilisation de *C. maltaromaticum* DSM20730 plus efficaces afin de réaliser les mesures sur un plus grand

nombre de bactéries. En effet, les mesures présentées ici ont été réalisées sur des bactéries ayant été immobilisées par le P.E.I., ce qui ne représente qu'une infime partie de la population de départ. Il est donc nécessaire de s'assurer qu'il ne s'agit pas de variants présentant des propriétés de surface différentes de la population générale.

Conclusion générale et perspectives

Chapitre III : Conclusion générale et perspectives

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans la continuité de la thématique conduite au Laboratoire d'Ingénierie des Bio-molécules concernant l'étude des interactions entre peptides antibactériens et membranes biologiques, la compréhension des mécanismes d'action des bactériocines de classe IIa ainsi que les phénomènes de sensibilité/résistance à ces molécules.

Les premiers travaux présentés sont relatifs à la stratégie suivie en vue de l'obtention de bactériocine purifiée. Une fois celle-ci disponible, il s'agissait alors de définir les modèles bactériens. Pour cela, une étude des propriétés physico-chimiques des surfaces de différentes souches bactériennes a été réalisée afin d'établir un lien entre ces propriétés et la sensibilité des souches analysées. Une fois les modèles retenus, les mécanismes d'action de Cbn BM1 ont alors été étudiés sur *Carnobacterium maltaromaticum* DSM20730, *Listeria monocytogenes* EGDe et *Listeria monocytogenes* EGDe Δ mp*I*. Enfin, des résultats préliminaires de l'impact de Cbn BM1 sur les propriétés nano-mécaniques *C. maltaromaticum* DSM20730 ont été présentés.

La première partie de la réalisation de ces travaux a été consacrée à l'obtention de bactériocines purifiées en quantité et de pureté suffisante. Cette étape est un des facteurs limitant de nombreuses études relatives aux bactériocines de classe IIa. Malgré la mise au point d'un système d'expression hétérologue chez *Escherichia coli* de Cbn BM1 et Cbn B2 fusionnées avec la thiorédoxine (Jasniewski *et al.*, 2008c), de nombreuses difficultés au niveau de la purification à l'échelle semi-preparative ont été rencontrées. Le choix a donc été fait de faire appel à des peptides synthétisés par voie chimique. Cbn BM1 a pu être obtenu par synthèse chimique en quantité suffisante et avec un haut niveau de pureté (> 95%). Ce dernier critère est primordial car les impuretés de synthèse sont des peptides tronqués et pourraient conduire à l'observation de phénomènes artefactuels lors des études de mécanisme d'action.

L'oxydation de Cbn BM1 au niveau du résidu 41 n'affecte pas sa structuration en hélice α lorsqu'il est placé en condition mimant les membranes (solution de trifluoroéthanol), ni son activité antibactérienne. Une différence de concentration inhibitrice est toutefois observable entre les essais réalisés avec le peptide obtenu par synthèse chimique et ceux

réalisés par Jasniewski *et al.* (2009) avec le peptide obtenu par expression hétérologue. Ainsi, pour *C. maltaromaticum* DSM20730, une inhibition de croissance analogue est observée avec une concentration de 2,5 mg.L⁻¹ de peptide de synthèse et 0,625 mg.L⁻¹ de peptide issu de la purification après l'expression hétérologue. Il ne peut cependant pas être conclu que cette différence d'activité puisse être causée par l'oxydation de la méthionine. Ceci peut être la conséquence d'une différence de pureté du peptide utilisé. En effet, il est très probable qu'à l'issue de la purification suivant l'expression hétérologue une certaine quantité d'acide trifluoroacétique (T.F.A.) demeure présente. Des essais d'inhibition de croissance en milieu liquide due à ce composé ont montré que le T.F.A. a un impact sur la croissance de *C. maltaromaticum* DSM20730 à des concentrations extrêmement faibles, bien que ceci ne soit pas observable par des tests d'activité en milieu gélosé. La présence de T.F.A. dans la solution de Cbn BM1 pourrait donc conduire à une sur-évaluation de l'activité antibactérienne de Cbn BM1.

La visualisation de l'activité de Cbn BM1 sur les souches bactériennes modèles *C. maltaromaticum* et *L. monocytogenes* a été réalisée à l'aide de deux méthodes. La première permet de déterminer le ratio entre les bactéries présentant une membrane intacte et celles présentant des dommages conduisant à la perméabilité membranaire. Cette approche a permis de mettre en évidence l'hétérogénéité de réponse de la population bactérienne, que ce soit pour *C. maltaromaticum* DSM20730 ou *Listeria monocytogenes* EGDe, face à un même traitement. Des mesures topologiques des surfaces des bactéries par microscopie de force atomique ont ensuite été réalisées. La microscopie de force atomique, contrairement à tous les autres types de microscopie, permet de visualiser l'impact de l'action de Cbn BM1 sans traitement particulier pouvant engendrer une altération des surfaces conduisant à des observations artefactuelles. Il a ainsi pu être mis en évidence l'existence d'atteintes morphologiques importantes de *C. maltaromaticum* DSM20730 et de *L. monocytogenes* EGDe suite à un traitement par Cbn BM1. Ces mesures ont également confirmé l'hétérogénéité de réponse au sein des populations traitées par Cbn BM1.

L'analyse des fluidités membranaires par anisotropie de fluorescence a montré que Cbn BM1 ne pénétrait pas au sein de la bicouche lipidique de *Listeria monocytogenes* EGDe et, par conséquent, agissait selon soit le modèle dit "tapis" soit le modèle "toroïdal" où le peptide n'interagit qu'avec les têtes polaires des phospholipides membranaires. La même analyse réalisée sur *C. maltaromaticum* DSM20730 a montré que Cbn BM1 pénétrait au sein de la bicouche lipidique de cette bactérie, adoptant donc un mécanisme de poration dit en

douves de tonneau. Ces résultats montrent donc qu'une bactériocine de classe IIa peut présenter différents mécanismes d'action selon la souche cible testée. Cette différence entre le mécanisme d'action de Cbn BM1 sur *C. maltaromaticum* et sur *L. monocytogenes* peut être gouvernée par des propriétés de surface différentes entre les deux souches. En effet, les résultats de P.C.A. obtenus à partir des mesures d'adhésion aux solvants montrent que ces deux espèces présentent des propriétés physico-chimiques de surface différentes. Si ces propriétés ne permettent pas d'établir un lien avec les phénomènes de sensibilité/résistance, il ne peut être exclu qu'elles puissent intervenir dans la détermination du modèle de mécanismes d'action des bactériocines de Cbn BM1. Ceci vient donc confirmer les observations faites par Jasniewski *et al.* (2008) avec la mésentéroïne 52A sur différents modèles bactériens où des différences de propriétés de surface sont corrélées à des différences de mécanisme d'action.

La possibilité qu'une même bactériocine présente différents mécanismes d'action en fonction de la souche cible et engendre une hétérogénéité de réponse sur une population bactérienne montre la complexité de l'étude des bactériocines de classe IIa. Une généralisation de leurs mécanismes d'action est donc impossible. Les résultats obtenus ajoutent également un autre degré de complexité en montrant que la sensibilité à Cbn BM1 est dépendante de l'état physiologique de la souche cible. Il serait donc intéressant de poursuivre ces études sur un ensemble de bactéries présentant une homogénéité de leur état physiologique en faisant appel à des cultures menées en réacteur continu, où il est possible de fixer le taux de croissance spécifique. Ceci permettrait de déterminer si le pourcentage observé de la population ne présentant pas d'atteinte de la membrane plasmique suite à un traitement par Cbn BM1 est dû à une hétérogénéité des états physiologiques ou à une hétérogénéité de sensibilité au sein d'une population présentant un même état physiologique.

Ainsi, quel que soit le niveau d'action étudié (perturbation de la fluidité membranaire, de la force proto-motrice ou de l'intégrité morphologique), *C. maltaromaticum* DSM20730 révèle une sensibilité à Cbn BM1 uniquement lorsque les cellules sont en phase exponentielle de croissance. Cbn BM1 cible donc préférentiellement les cellules en division actives et constitue ainsi une "arme" sélective optimale. En effet, la compétition entre les bactéries au sein d'un même environnement ne s'explique pas par l'unique présence simultanée dans un même milieu de différentes souches. Une souche bactérienne n'est réellement en compétition avec une autre que si elles doivent utiliser les mêmes ressources au même moment. Ainsi, même si deux souches font appel aux mêmes substrats dans le milieu pour se développer, elles ne seront réellement en compétition que si elles sont toutes deux en croissance. Il est

plausible que les mécanismes évolutifs aient conduit à la sélection de bactériocines ne ciblant uniquement les bactéries en réelle compétition donc en division et, le plus souvent, proches phylogénétiquement. En effet, cibler uniquement ces souches conduit à diminuer la quantité nécessaire de bactériocines à produire et ainsi à dédier une moindre quantité de ressources à la compétition dans le milieu. Jasniewski *et al.* (2008) ont montré que Cbn BM1 présente une synergie d'action avec une autre carnobactériocine, Cbn B2, également produite par *C. maltaromaticum* CP5. Il pourrait être intéressant de voir si cette synergie peut reposer sur un ciblage d'une même bactérie mais présentant des états physiologiques différents ou sur deux mécanismes d'action distincts.

Une détermination des propriétés nano-mécaniques des échantillons est possible grâce à l'A.F.M.. L'état actuel de développement des mesures de nano-mécaniques sur des échantillons bactériens fait que l'étape limitante est l'immobilisation de l'échantillon sur le support. En effet, le développement notamment des pointes (matériaux, profils, fréquences de résonnance), des systèmes de mesure (système piezzo-électrique, détecteur) et de modélisation a été beaucoup optimisé depuis la création de ce type de microscopie qui avait à l'origine pour but l'étude des matériaux. Le potentiel de cette technique pour les différents domaines des sciences du vivant est récent et il reste encore nombre d'optimisation à réaliser pour l'immobilisation des objets biologiques. Compte tenu des difficultés rencontrées lors de nos études pour fixer les bactéries sur lame de verre, il pourra être intéressant de faire appel à des surfaces micro-structurées afin d'immobiliser mécaniquement les bactéries. Ce type de support permettrait en effet de confiner une seule bactérie dans un puits et, par conséquent, de s'affranchir de ses propriétés de surface pour l'immobiliser. Il sera toutefois à prendre en compte que l'utilisation d'un tel support conduit à l'existence de contraintes mécaniques. Ainsi, en cas d'augmentation significative de la turgescence, celle-ci sera limitée par l'espace disponible dans le support. Les valeurs obtenues seront alors relatives aux conditions expérimentales. Une autre approche en vue d'étudier les propriétés nano-mécaniques de bactéries pourrait débiter par la recherche de souches présentant des propriétés de surface permettant une immobilisation aisée par les techniques déjà existantes. Ceci nécessiterait alors de réaliser un double criblage ayant pour critères à la fois la sensibilité à la bactériocine étudiée et des propriétés de surface particulières. Ces critères ne sont pas nécessairement compatibles entre eux ou pourraient limiter le cadre des études à un modèle particulier peu représentatif, même s'il apparaît déjà clairement que toute tentative de généralisation apparaît comme vaine.

Il peut être utile de développer d'autres méthodes pour appréhender et visualiser l'action des bactériocines de classe IIa en général et de Cbn BM1 dans le cadre de nos études. Une approche de titration calorimétrique isotherme a été initiée afin de déterminer l'affinité de Cbn BM1 pour différentes souches bactériennes. Cette technique permet de déterminer les paramètres thermodynamiques des interactions entre deux composés en mesurant les dégagements, ou la consommation, d'énergie sous forme de chaleur. Cette approche est couramment utilisée pour caractériser les interactions entre peptide et ions métalliques, peptide et cofacteur ou encore peptide et ADN (Housden et Kleanthous, 2011 ; Falconer et Collins, 2011). Nous avons tenté d'étudier le système d'interaction entre bactériocine et bactérie. Les différents essais réalisés avec différentes concentrations soit en bactéries (*C. maltaromaticum* DSM20730), soit en peptide ou avec différents composés dont l'interaction avec la souche étudiée était avérée (nisine et valinomycine) n'ont pas pu conduire à l'observation de dégagement de chaleur. Ceci pourrait s'expliquer soit par un dégagement de chaleur trop faible par rapport au bruit de fond généré par le métabolisme des bactéries durant l'expérimentation, soit par un mécanisme d'interaction ne mettant en jeu qu'une quantité extrêmement faible d'énergie ou encore par une sensibilité de détection inadaptée à ce type de système. Bien que ces études exploratoires n'aient pas été concluantes, d'autres essais pourraient être envisagés. Ceux-ci devront être conçus de façon à s'affranchir du métabolisme basal des bactéries et, par conséquent, constitués de modèles artificiels. Ces modèles pourront donc être constitués d'extraits membranaires totaux (membrane et protéines membranaires), d'extraits de la paroi et éventuellement d'extraits de composés intracellulaires.

Il est envisageable que les bactériocines de classe IIa puissent avoir également des cibles intracellulaires. Bien que les bactériocines de classe IIa soient synthétisées par des bactéries, elles partagent un nombre de propriétés (charge, hydrophobicité, structuration) analogues à celles de certains peptides antimicrobiens d'origine eucaryote. L'activité antibactérienne de certains d'entre eux tels que la pyrochoricine, la buforine II ou l'indolicidine repose sur leur capacité de fixation à l'ADN. Une prédiction de fixation de l'ADN par Cbn BM1 à l'aide d'un algorithme dédié (Ahmad et Sarai, 2005 ; <http://www.netasa.org/dbs-pssm>) donne d'ailleurs une probabilité de fixation de 75,8 %. Bien que des essais préliminaires de retard de migration sur gel entre Cbn BM1 et de l'ADN plasmidique linéarisé n'aient pas permis de conclure dans ce sens, d'autres approches sont envisageables telles que des mesures de compétition avec un agent intercalant (LePecq et

Paoletti, 1967), de luminescence de l'ADN (Nyarko *et al.*, 2004) ou encore de fluorescence des résidus tryptophanes de Cbn BM1 (W16 et W34).

Afin d'établir un lien entre les propriétés physico-chimiques de surface et les phénomènes de sensibilité/résistance à Cbn BM1, ces propriétés ont été déterminées sur dix-huit souches bactériennes, réparties en cinq genres (*Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Listeria*). Les résultats obtenus révèlent une grande variation de ces propriétés concernant l'hydrophobicité et le caractère donneur/accepteur d'électrons. Il en est de même concernant les valeurs d'épaisseur de la couche perméable aux ions et la densité de charge électrique. Les paramètres choisis, ainsi que les méthodes sélectionnées, n'ont pas permis d'établir un lien direct entre ces paramètres et la sensibilité/résistance des souches testées.

L'incapacité à établir le lien entre les propriétés testées et la sensibilité de Cbn BM1 ne doit toutefois pas exclure un rôle important de ces propriétés dans les mécanismes d'action de Cbn BM1. Une analyse critique des deux approches retenues, l'adhésion aux solvants et la mobilité électrophorétique, doit alors être réalisée. En effet, ces approches présentent une limite majeure, probablement à l'origine de leur incapacité à lier propriétés de surface et sensibilité à une bactériocine de classe IIa. Cette limite, existante également avec d'autres outils d'étude de propriétés de surface tels que la mesure des angles de contact, repose sur le fait que les surfaces des objets étudiés, ici des bactéries, soient considérées comme homogènes. En effet, il est concevable que les mécanismes d'action des bactériocines de classe IIa, et notamment leur interaction avec la surface des bactéries cibles, soient modulés par des propriétés physiques locales. Des travaux de mesures de forces par microscopie de force atomique ont révélé l'existence d'îlots de haute hydrophobicité à la surface de bactéries (Dorobantu *et al.*, 2008). Si une telle localisation de propriétés physico-chimiques données est impliquée dans le mécanisme d'action des bactériocines de classe IIa, des approches globales telles que l'adhésion aux solvants ou les mesures de mobilité électrophorétique ne peuvent pas le révéler. La poursuite des études portées sur les liens entre les propriétés des surfaces devra donc prendre en compte l'hétérogénéité des surfaces bactériennes. Cette dernière devra être confirmée par criblage des surfaces à l'aide de la microscopie de force atomique faisant appel à des sondes hydrophobes. Une fois celle-ci mise en évidence, une approche de mesure de force faisant appel à un greffage de la bactériocine sur la pointe permettrait de montrer l'éventuelle localisation préférentielle des interactions entre surface bactérienne et

bactériocine en lien avec l'hétérogénéité de la surface. Une telle approche permettra de réaliser, malgré une approche technique délicate, une nette avancée dans la compréhension des mécanismes d'action des bactériocines de classe IIa.

Pour conclure, les bactériocines de classe IIa présentent un grand intérêt tant au niveau de la compréhension des phénomènes de compétition de flore dans les écosystèmes complexes que de leurs applications technologiques présentes et à venir. Malgré l'historique conséquent des travaux de recherche les concernant, de nombreuses avancées demeurent à réaliser pour élucider pleinement leurs mécanismes d'action, malgré l'évidente complexité que représente cette tâche. Celle-ci pourra alors sans aucun doute réaliser un pas en avant en s'enrichissant des concepts et savoir-faire de disciplines scientifiques telles que la biophysique jusque là peu exploitées dans le domaine de la microbiologie.

Il s'agira alors de réussir la difficile tâche de traiter des systèmes vivants, par nature complexes, à l'aide des outils techniques et théoriques de la physique.

Annexes



Contents lists available at ScienceDirect

Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fm

Review

Carnobacterium maltaromaticum: Identification, isolation tools, ecology and technological aspects in dairy products

Muhammad Inam Afzal^a, Thibaut Jacquet^a, Stéphane Delaunay^b, Frédéric Borges^a, Jean-Bernard Millière^a, Anne-Marie Revol-Junelles^a, Catherine Cailliez-Grimal^{a,*}

^a Nancy-Université, Institut National Polytechnique de Lorraine, Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules, 2, avenue de la Forêt de Haye, B.P. 172, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

^b Nancy-Université, Institut National Polytechnique de Lorraine, Laboratoire Réaction et Génie des Procédés, UPR CNRS 3349, 2, avenue de la Forêt de Haye, B.P. 172 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 December 2009

Received in revised form

26 March 2010

Accepted 28 March 2010

Available online 8 April 2010

Keywords:

Carnobacterium

Dairy products

Identification tools

Aroma

Flavours

Ripening

ABSTRACT

Carnobacterium species constitute a genus of Lactic Acid Bacteria (LAB) present in different ecological niches. The aim of this article is to summarize the knowledge about *Carnobacterium maltaromaticum* species at different microbiological levels such as taxonomy, isolation and identification, ecology, technological aspects and safety in dairy products. Works published during the last decade concerning *C. maltaromaticum* have shown that this non-starter LAB (NSLAB) could present major interests in dairy product technology. Four reasons can be mentioned: i) it can grow in milk during the ripening period with no competition with starter LAB, ii) this species synthesizes different flavouring compounds e.g., 3-methylbutanal, iii) it can inhibit the growth of foodborne pathogens as *Listeria monocytogenes* due to its ability to produce bacteriocins, iv) it has never been reported to be involved in human diseases as no cases of human infection have been directly linked to the consumption of dairy products containing this species.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Strains from *Carnobacterium maltaromaticum* are facultatively anaerobic, catalase negative, Gram positive rod shaped LAB which produce ι (+)-lactic acid from glucose (Collins et al., 1987). Their presence at various levels in food including fish, meat and dairy products has resulted in an increased number of scientific investigations to study their ecology, role and effect on these food products. For decades, the emphasis has been on product developments in the dairy industry with respect to organoleptic properties and/or health protection such as the control of foodborne pathogens. As discussed in this review, the major potential role of *C. maltaromaticum* might be as a ripening flora by producing flavouring compounds and as a biopreservative flora, by inhibiting the growth of foodborne pathogens.

This review focuses on the taxonomy and methods for isolation and identification of *C. maltaromaticum* and its place and role in dairy products.

2. Taxonomy

The genus *Carnobacterium* was proposed for the reclassification of atypical heterofermentative *Lactobacillus* species (group III) isolated from vacuum-packed meat, chicken and fish, and is unable to grow on acetate agar (Collins et al., 1987; Hammes and Hertel, 2006). Based on their habitats, two ecological groups can be defined with group I associated with animal and products of animal origin and group II present in a cold environment (Hammes and Hertel, 2009). These rod shaped LAB produce ι (+)-lactic acid from glucose and are characterized by the presence of meso-diaminopimelic acid in their cell-wall composition. The *Carnobacterium* species form a phylogenetically coherent group which is quite distinct from other LAB, as shown by sequencing of the 16S rDNA (Wallbanks et al., 1990). At first, this new genus contained four strains, *Carnobacterium divergens* comb. nov., *Carnobacterium piscicola*, *C. gallinarum* sp. nov. and *C. mobile* sp. nov. *C. piscicola* (Collins et al., 1987) and *Lactobacillus maltaromaticus* isolated from milk (producing a malty-like flavour and aroma) (Miller et al., 1974) are heterotypic synonyms (Mora et al., 2003). So, the authors validated the name *C. maltaromaticum* and described the physiological and biochemical properties of this new species.

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

The type strain of *C. maltaromaticum* is DSM 20342^T (=ATCC 27865^T = CCUG 30142^T = CIP 103135^T = JCM 1154^T = LMG 6903^T = NRRL-B 14852^T) (Mora et al., 2003).

Lai and Manchester (2000) have revisited the current taxonomic classification of this genus using a numerical phenetic. Based on 92 unit characters, three cluster-groups were identified with the cluster group A equated with *C. maltaromaticum*. Currently the genus *Carnobacterium* contains ten species (Kim et al., 2009; Leisner et al., 2007) but only *C. maltaromaticum* and *C. divergens* have a potential interest in relation to dairy products (Laursen et al., 2005; Millière et al., 1994; Morea et al., 1999).

3. Identification tools

Both phenotypic and genotypic techniques have been utilized to deduce accurate phylogenetic information or to improve the quality of identification. Many typing methods and techniques, looking at phenotypic or genotypic level, have been developed (Vandamme et al., 1996). The use of one or a combination of different methods relies on four main characteristics: discriminatory levels (genus, species or intraspecies), reproducibility (at short and long term), ease of use and cost. Phenotypic methods are more time-consuming and are restricted to a few species; molecular methods require more expensive equipment but are more reproducible and applicable to a wider variety of species (Pot, 2008). In the case of *Carnobacterium* species, phenotypic or genotypic approaches were developed and applied on *C. maltaromaticum*, isolated from different food types (Table 1). These techniques could be applied for identification of *C. maltaromaticum* isolated in dairy products.

3.1. Phenotypic identification

To characterize *C. maltaromaticum* strains, the numerical taxonomic approach used traditional biochemical reactions, carbohydrate fermentation and inhibition tests (temperature, pH, salt, chemical preservatives, antibiotics, bacteriocins) (Lai and Manchester, 2000; Laursen et al., 2005). Simple identification keys must be used with caution. However, when a larger number of phenotypic tests were used and data evaluated by numerical taxonomy, the identification of *Carnobacterium* at species level was

obtained with the same degree of confidence as with genotypic tools (Laursen et al., 2005).

The differentiation of *C. maltaromaticum* from *C. divergens* in meat and seafood has been obtained by the method of SDS-PAGE of whole-cell proteins (Laursen et al., 2005). It is possible to assign a protein profile to each known bacterial species by comparison with a database of normalized protein fingerprints derived from reference strains (Vandamme et al., 1996).

Since the development of chemometric methods to obtain biochemical information from hyperspectral data, Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy has been used in a whole-cell analysis (Mariey et al., 2001). The FT-IR spectroscopy has allowed the differentiation of *C. maltaromaticum* taxon among 67 *Carnobacterium* strains. It is correlated with the results obtained by other methods, i.e. Pyrolysis mass spectrometry (PyMS) or DNA–DNA hybridization or 16S rDNA sequence comparisons (Manchester et al., 1995). The culture age has no major effect on the spectra obtained and the reproducibility is good over a six-month period, making FT-IR spectroscopy a rapid and reliable method for the identification of *Carnobacterium* species (Lai et al., 2004).

3.2. Genotypic identification

Carnobacteria have been identified at the genus level by nucleic acid hybridization by using 16S rDNA targeted genus specific probes (Nissen et al., 1994). Species-specific primers have been designed according to sequences of 16S rDNA (Barakat et al., 2000; Brooks et al., 1992; Nissen et al., 1994; Scarpellini et al., 2002) and used in multiplex PCR amplification (Macian et al., 2004; Pelle et al., 2005; Yost and Nattress, 2000). However, the PCR primers used were not specific enough to differentiate between *Carnobacterium* species. The intergenic spacer region (ISR) located between the 16S and the 23S genes was shown to be more adapted for discrimination of *C. maltaromaticum* at the species/strain level whereas 16S and 23S ribosomal genes, which are genetically close between the different species of a same genus, are more convenient for the genus level identification. *C. maltaromaticum* was successfully detected and identified using one of these PCR-derived techniques (Chenoll et al., 2003; Scarpellini et al., 2002).

Table 1
Methods used for the identification of *C. maltaromaticum*.

Methods	Isolates from	Reference
SDS-PAGE	Meat, seafoods	Laursen et al., 2005
Pyrolysis mass spectrometry	— ^a	Manchester et al., 1995
Fourier Transform Infrared Spectroscopy	—	Lai et al., 2004
16S or 23S rDNA	Meat, Poultry meat	Wallbanks et al., 1990, Brooks et al., 1992, Nissen et al., 1994, Barakat et al., 2000, Scarpellini et al., 2002
Multiplex PCR	Meat	Yost and Nattress 2000
Multiplex PCR	Various meat products	Macian et al., 2004
Multiplex PCR	Cold-smoked salmon	Pelle et al., 2005
Intergenic Spacer Region polymorphism (ISR)/Restriction	—	Kabadjova et al., 2002; Chenoll et al., 2003;
Fragment Length polymorphism (RFLP)	—	Rachman et al., 2004;
Specific primers Pis A	Lake whitefish	Loch et al., 2008
	Cold-smoked salmon	Pelle et al., 2005
	Lake whitefish	Loch et al., 2008
Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)	Meat, seafoods	Laursen et al., 2005
Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)	Mozzarella	Morea et al., 1999
	Atlantic cod	Seppola et al., 2006
	Refrigerated meat	Ercolini et al., 2009
Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)	Cold-smoked fish	Duffes et al., 1999b
Peptidoglycan hydrolase	Cold-smoked fish	Duffes et al., 1999b

^a not determined.

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (Jensen and Stanton, 1993; Navarro et al., 1992) was applied on PCR-amplified 16S rDNA of 42 strains of eight *Carnobacterium* species (Kabadjova et al., 2002). Three PCR amplicons, designated small, medium and large ISR, were obtained with all *Carnobacterium* species tested. The large ISR sequence revealed the presence of two tRNA genes, which were separated by a spacer that varied from 24 to 38 bp in length depending on the *Carnobacterium* species. This variable region allowed the design of species-specific primers. The restriction patterns obtained by TaqI, HinfI and HindIII allowed a discrimination of *C. maltaromaticum* (Rachman et al., 2004).

Some *C. maltaromaticum* strains produce bacteriocins, e.g., piscicidin 126. As a consequence, this gene (*pisA*) can be used as a tool for this species identification, but it is restricted to bacteriocin-producing strains (Pelle et al., 2005). The *pisA* gene allowed the recent isolation of a new strain which is closely related to *C. maltaromaticum* involved in a freshwater fish (*Coregonus clupeaformis*) pseudokidney disease (Loch et al., 2008).

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) is based on the selective PCR amplification of restriction fragments from a total digest of genomic DNA (Vos et al., 1995). Laursen et al. (2005) applied this method to 59 *Carnobacterium* strains which allowed them to distinguish between two intraspecies groups of *C. divergens* strains but not *C. maltaromaticum* that appeared to be a monophyletic group.

Thanks to Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD), strains of *C. maltaromaticum* have been identified in various ecosystems (as discussed later by Ercolini et al., 2009; Morea et al., 1999). It is a discriminative identification method due to its high fingerprinting capacity. The oligonucleotide primers are arbitrarily designed, so it is not necessary to know the part of the genome involved in the fingerprinting. Moreover, its use of small amounts of DNA and is not very time-consuming (Gurtler and Mayall, 2001; Hadrys et al., 1992; Morea et al., 1999; Ruiz et al., 2008).

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), a method developed for the separation of large DNA molecules, was applied to trace sources of microbial contamination (Dalgaard et al., 2003) and to characterize *Carnobacterium* strains (Dalgaard et al., 2003; Duffes et al., 1999b).

4. *C. maltaromaticum* in dairy products

4.1. Isolation and numeration of *C. maltaromaticum*

The isolation and identification of bacterial strains associated with food and dairy products appear to be the most restrictive and controversial steps in microbial taxonomy. Different culture media are available for the nonselective, semi-selective or selective recovery of this *Carnobacterium* genus (Hammes and Hertel, 2006). The Cresol Red Thallium Acetate Sucrose (CTAS) agar has been suggested for selective detection and isolation of carnobacteria (Baird et al., 1989; Holzapfel, 1992). This medium may allow the growth of some *Leuconostoc* and *Enterococcus*. Incubation is either at 30 °C for 24–48 h or at 25 °C for 3–4 days (Baird et al., 1989; Holzapfel, 1992). The elective EBRER medium (Millière et al., 1994) needed psychrotrophic conditions of incubation (7 °C for 10 d) to allow a good recovery of this genus. The Cresol Red Thallium Acetate Sucrose Inulin Agar (CTSI) has a limited use for automatic numeration due to its red colour, opacity, complexity and incubation time of 4 days (Wasney et al., 2001).

Specific isolation of *C. maltaromaticum* on a solid medium can be performed on the basis of its growth ability at an alkaline pH value (up to 9.6) and its antibiotic resistance pattern. Thus, a new medium, named CM (*C. maltaromaticum*), was designed. This selective medium is based on the TS–YE agar supplemented with

vancomycin (3.5 mg L⁻¹), gentamicin (5.0 mg L⁻¹) and nalidixic acid (20 mg L⁻¹) with an alkaline pH value of 8.8. After incubation for 36–48 h at 25 °C, its high selectivity for *C. maltaromaticum* was demonstrated with multiple dairy strains (Edima et al., 2007). It was shown that this medium is suitable for pre-enrichment.

Three methods, flow cytometry, epifluorescent microscopy and *in situ* hybridization were used in order to enumerate *C. divergens* and *C. maltaromaticum* (Connil et al., 1998). These methods, once coupled together, allowed a rapid and specific enumeration of these bacteria in mixed cultures. At first, protein and lipids must be removed by the use of enzymes, detergent and centrifugation before applying these techniques to dairy products (Gunasekera et al., 2003).

DNA–DNA hybridization was also shown to be a powerful method for the detection and the quantification of *Carnobacterium* sp. in various food products. For instance, colony hybridizations with a specific DNA probe of the genus (CB1) were used to follow the presence of *Carnobacterium* (Larroure-Thivey et al., 2003).

A sensitive real-time PCR assay using Sybr Green I-based detection has been optimized to specifically quantify *Carnobacterium* sp. Using genus or species-specific primers (Rachman et al., 2004), a reliable and fast screening of *C. maltaromaticum* was reported (Cailliez-Grimal et al., 2005). Detection limits for real-time PCR were satisfactory ($\geq 10^4$ cfu g⁻¹ of cheese) in relation to expected levels of this species in these products (10^5 to 10^8 cfu g⁻¹ of cheese).

4.2. Presence of *C. maltaromaticum* in dairy products

C. maltaromaticum strains are widely found in food including a few dairy products (Table 2). It was first isolated from milk having developed a distinct malty or chocolate like flavour and aroma which correspond to the presence of aldehydes (3-methylbutanal, 2-methylbutanal, 2-methylpropanal) (Miller et al., 1974).

The presence of *C. maltaromaticum* in Brie cheeses, a variety of AOP (protected designation of origin) French surface mould-ripened soft cheese, was reported for the first time in 1994 (Millière and Lefebvre, 1994; Millière et al., 1994) and confirmed in 2007 (Cailliez-Grimal et al., 2007). Out of 30 French soft-ripened or red-smear cheeses made from cow's, ewe's or goat's milk (raw or pasteurized), 10 contained this species, and isolates from three cheeses exhibited anti-*Listeria* activity (Cailliez-Grimal et al., 2007). In cheeses tested, *C. maltaromaticum* constituted the main psychrotrophic LAB flora. Its growth was able to continue even at an alkaline pH value, reaching high levels (10^8 – 10^9 cfu g⁻¹) at the end of a further cold (4 °C) storage period (Cailliez-Grimal et al., 2007). It may appear as a potential ripening flora in soft cheese (Edima et al., 2008). This species was also found to be a citrate-fermenting member of the microflora involved in Mozzarella cheese fermentation and constitutes 70% of the curd (Morea et al., 1999).

C. maltaromaticum is a slow acidifying species compared to commercial starter LAB, such as *Lactococcus lactis* or *Streptococcus thermophilus*. However, the psychrotrophic *C. maltaromaticum* LMA 28 strain can sustain low pH values in co-culture with *Lc. lactis* DSMZ 20481 or *S. thermophilus* INRA 302 (Edima et al., 2008).

As a consequence of their slow acidifying activity, *Carnobacterium* strains cannot be used as a starter and can therefore be considered as NSLAB. Nevertheless, they could contribute to cheese ripening. From a cheese making technology point of view, some NSLAB strains showed appropriate technological characteristics for their use as adjunct cultures in soft and semihard cheeses (Briggiler-Marco et al., 2007). These NSLAB may positively contribute to the aroma development of soft cheeses. This production of aroma depends, among other things, on the catabolism of branched-chain amino acids, i.e. leucine, isoleucine

Table 2
Carnobacterium maltaromaticum in food products.

Products	Microbial counts	Number of isolates of <i>C.m</i> /total isolates ^a	Sensory impact	Reference
Dairy				
Skimmed milk	10 ⁶ cfu g ⁻¹	1	Malty aroma	Miller et al., 1974
Soft cheeses	10 ⁸ –10 ⁹ cfu g ⁻¹	10 ⁶ cfu g ⁻¹	No off-flavours	Millière and Lefebvre 1994
	10 ⁶ –10 ⁷ cfu g ⁻¹	33/36	No off-flavours	Millière et al., 1994
Mozzarella	10 ⁵ –10 ⁶ cfu g ⁻¹	2/25	No off-flavours	Cailliez-Grimal et al., 2007
Fish and shellfish				Morea et al., 1999
MAP salmon ^b	10 ⁶ –10 ⁸ cfu g ⁻¹	21/28	No off-flavours	Emborg et al., 2002
Cold-smoked salmon	—	97/155	Malt culture medium	Leroi et al., 1998
	10 ⁶ –10 ⁷ cfu g ⁻¹	221/255	Slightly sour, sweet/nauseous (vacuum) Oxydized, bitter and fishy/malty (MAP)	Paludan-Muller et al., 1998
	—	22/160	No spoilage odour detected	Duffes et al., 1999a
Cooked and peeled	—	9/137	—	Jaffres et al., 2009
Shrimp	—	11/58	Sensory score acceptable with flavour of chlorine-like	Mejlholm et al., 2005
Brined shrimp	—	5/134	Fermented Fishy, sour Rancid, yellowish	Mejlholm et al., 2008
Meat				
MAP beef muscles	—	7/79	VOC Aldehydes, lactones, sulphur compounds ^c	Ercolini et al., 2009
MAP broiler	—	96/447	Not determined	Vihavainen et al., 2007
Marinated pork	—	Few	No spoilage odour detected	Schirmer et al., 2009

^a C.m: *Carnobacterium maltaromaticum*.

^b MAP: Modified atmosphere-packed.

^c not use of sensory analysis but detection of VOC: volatile organic compounds.

and valine by the bacterial transaminases (Ardo, 2006; Marilley and Casey, 2004; Smit et al., 2004, 2005). From leucine, *C. maltaromaticum* produced α -ketoisocaproic acid, 3-methylbutanal and 3-methylbutanol, from isoleucine, 3-methylbutanoic acid, 2-methylbutanal and from valine, 2-methylbutanol, 2-methylpropanal and 2-methylpropanol. It has been suggested that these aldehydes convey the malty aroma that is the characteristic of *C. maltaromaticum* in milk (Larroure-Thivey et al., 2003; Laursen et al., 2006; Miller et al., 1974; Smit et al., 2005). The corresponding alcohols (3-methylbutanol, 2-methylbutanol and 2-methylpropanol) have an impact on the alcoholic and fruity odours (Thierry and Maillard, 2002). The branched-chain acids (2-methylpropanoic acid, 3-methylbutanoic acid, 2-methylbutanoic acid) are responsible for sweaty, rancid, faecal, putrid ester and rotten fruit like flavours (Marilley and Casey, 2004; Thierry and Maillard, 2002).

Not much is known about their metabolism during growth in cheese products, but this bacterium did not cause off-flavours and could possibly even play a beneficial role in texture and taste during cheese ripening (Millière and Lefebvre, 1994; Millière et al., 1994).

5. Preservation of food

The genus *Carnobacterium* is well known for its ability to produce bacteriocins (Leisner et al., 2007). Six bacteriocins, belonging to class IIa, IIc and one cyclic, have been described for different *C. maltaromaticum* strains. These bacteriocins are effective against spoilage microorganisms and inhibit the pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes* (Table 3). The genera *Carnobacterium* and *Listeria* are both psychrotrophic and have the same behaviour towards pH and temperature variations (milk prematuration and end of ripening). The use of bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains isolated from cheese or from other foods is very well documented. It could prevent the growth of *L. monocytogenes* during critical phases in a variety of refrigerated foods (Buchanan and Klawitter, 1992a, 1992b; Cailliez-Grimal et al., 2007; Herbin et al., 1997).

The effect of piscicolin 126, a bacteriocin produced by *C. piscicola* JG126, was investigated on the growth of *L. monocytogenes* and cheese starter bacteria in milk and camembert cheese (Wan et al., 1997). Its addition effectively inhibited the growth of *L. monocytogenes* in camembert cheese without affecting viable counts and acid production of starter cultures. The control of piscicolin 126 production in *C. maltaromaticum* UAL26 is an example of a regulated system of bacteriocin production that is effected by a specific growth temperature (25 °C), above which bacteriocin will not be produced at a detectable level in liquid media (Gursky et al., 2006).

Many studies have highlighted some biopreservation strategies for refrigerated foods such as cold-smoked salmon and ready-to-eat meat products (cooked chicken, minced meat) against the risk of *L. monocytogenes*. They used either bacteriocin produced by *Carnobacterium* species, including *C. maltaromaticum* strains, or the direct addition into food of a bacteriocin-producing *Carnobacterium* strain. The influence of different fermentation patterns on the production of a bacteriocin-like substance (BLS) from *C. maltaromaticum* Cp L103 strain using different culture broths has been investigated. This BLS was shown to have a bacteriostatic effect on *L. monocytogenes* on vacuum packaged salmon. However, as stated by the authors, the use of the single bacteriocin is not a sufficient safety factor against *L. monocytogenes* and other strategies such as a combination of two bacteriocins or the use of factors that increase their activity could be considered (Schöbitz et al., 2006). A lower storage temperature and the presence of bacteriocin-producing *C. maltaromaticum* have enhanced *L. monocytogenes* inhibition (Azuma et al., 2007; Brillet et al., 2004; Campos et al., 1997; Duffes et al., 1999a, 1999b; Yamazaki et al., 2003). Nevertheless, inactivation of bacteriocin by proteolytic enzymes, depending on the food, and the emergence of resistant strains (Schöbitz et al., 2003; Wan et al., 1997) have led to suggest the utilization of a bacteriocin negative *C. maltaromaticum* strain. This may be more suitable for the practical use of a biopreservative agent (Nilsson et al., 2004). Using such a strain, *L. monocytogenes* growth was reduced partly by glucose depletion (Buchanan and Bagi, 1997; Nilsson et al., 1999, 2005).

Table 3
Bacteriocins produced by *Carnobacterium maltaromaticum* strains.

Bacteriocins (class)	Strains	Bacteriocin activity against ^c	Molecular mass (AA) ^b	Location of gene (gene)	Reference
Carnobacteriocin BM1 (IIa)	LV17B	<i>C. divergens</i>	4524 (43)	Chromosome	Quadri et al., 1994
Cbn B1 ^a	LV17B	<i>E. faecalis</i>	4541 (43)	(<i>cbnBM1</i>)	
Piscicocin V1b ^a	V1	<i>Lb. curvatus</i>	4526 (44)		Bhugalo-Vial et al., 1996
Carnocin CP51 ^a	CP5	<i>Lb. plantarum</i>			Herbin et al., 1997
		<i>Ln. mesenteroides</i>			
		<i>L. innocua</i>			
		<i>L. monocytogenes</i>			
		<i>P. acidilactici</i>			
Carnobacteriocin B2 (IIa)	LV17B	<i>C. divergens</i>	4969 (48)	Plasmid	Quadri et al., 1994
A9b ^a	A9b	<i>L. monocytogenes</i>		(<i>cbnB2</i>)	Nilsson et al., 2002
Carnocin CP52 ^a	CP5				Herbin et al., 1997
Piscicolin 126 (IIa)	JG126		4416 (44)	Chromosome	Jack et al., 1996
Piscicocin V1 ^a	V1	<i>C. divergens</i>		(<i>pisA</i>)	Bhugalo-Vial et al., 1996
Piscicolin 126 ^a	UAL26	<i>Carnobacterium</i> sp.			Gursky et al., 2006
		<i>E. faecalis</i>			
		<i>E. faecium</i>			
		<i>Lb. curvatus</i>			
		<i>Ln. dextranicum</i>			
		<i>Ln. mesenteroides</i>			
		<i>L. grayi</i>			
		<i>L. innocua</i>			
		<i>L. ivanovii</i>			
		<i>L. monocytogenes</i>			
		<i>L. seeligeri</i>			
		<i>P. acidilactici</i>			
		<i>P. pentosaceus</i>			
		<i>S. thermophilus</i>			
Carnobacteriocin A (IIc)	LV17A	<i>C. divergens</i>	5052 (53)	Plasmid	Worobo et al., 1994
Piscicolin 61 ^a	LV61	<i>C. gallinarum</i>		(<i>cbnA</i>)	Holck et al., 1994
		<i>C. maltaromaticum</i>			
		<i>E. faecalis</i>			
Piscicocin CS526 (IIa)	CS526	<i>E. durans</i>	4430	ND	Yamazaki et al., 2005
		<i>E. faecalis</i>			
		<i>E. faecium</i>			
		<i>E. hirae</i>			
		<i>Ln. mesenteroides</i>			
		<i>L. grayi</i>			
		<i>L. innocua</i>			
		<i>L. monocytogenes</i>			
		<i>P. pentosaceus</i>			
Carnocyclin A	UAL307	<i>C. maltaromaticum</i>	5880–60	ND (<i>cclA</i>)	Martin-Visscher et al. 2008
		<i>C. divergens</i>			
		<i>E. faecalis</i>			
		<i>E. faecium</i>			
		<i>Lc. lactis</i>			
		<i>Ln. mesenteroides</i>			
		<i>L. monocytogenes</i>			
		<i>P. acidilactici</i>			
		<i>S. aureus</i>			

^a Synonym.

^b Numbers of amino acids.

^c B: *Brochothrix*; C: *Carnobacterium*; E: *Enterococcus*; L: *Listeria*; Lb: *Lactobacillus*; Lc: *Lactococcus*; Ln: *Leuconostoc*; P: *Pediococcus*; S: *Staphylococcus*; ND: not determined.

6. Safety assessment

The use of the *C. maltaromaticum* species as a protective agent in various food products regarding food safety could be limited due to its ability to produce tyramine from tyrosine. The level of tyramine produced varies depending on the food and on the strains (Masson et al., 1996; Leisner et al., 2007). In soft cheeses artificially inoculated with *C. maltaromaticum* LMA 28, no tyramine and histamine were detected (Edima, 2007). Since 2005, one strain of *C. maltaromaticum* (CB1) has been classed as Generally Recognized as Safe (GRN 00159) for use in ready-to-eat meat products. *C. maltaromaticum* has never been involved in human infection and cannot be considered as an opportunistic pathogen; only one case of isolation of this species from human pus has been reported in the medical literature (Chmelar et al., 2002).

7. Potential interest in cheese technology

To conclude, what can the role of the *C. maltaromaticum* species be in cheese technology? This opportunistic lactic acid bacterium is present in a low proportion in raw milk. It can grow in milk without coagulation because of a low production of L (+)-lactic acid from lactose due to a weak β -galactosidase activity, with no competition from starter LAB. It sustains low pH value (4.9) at the end of draining of soft cheese. It encounters propitious conditions at the end of ripening, after a cold storage period. At this step of cheese manufacture, at low temperature (13–14 °C) and high pH value (7–8), *C. maltaromaticum* can take over from the traditional LAB (i.e. *Lc. lactis* and *S. thermophilus*) which have already been lysed (Chamba, 2008). In appropriate conditions, it also produces aromatic substances (with a malt flavour), which could allow

a diversification of the cheese panel, in order to satisfy consumer demands. No product defect is related to the presence of this species in AOP soft cheeses. Moreover, the ability of *C. maltaromaticum* to produce bacteriocins inhibiting the growth of well-known foodborne pathogens such as *Listeria* sp. should reinforce the interest for its use as a non-starter LAB. However, further knowledge about metabolic pathways involved in the biosynthesis of flavouring compounds, about the regulation of bacteriocin production and the mechanisms of action of these molecules appears to be still necessary in order to promote a wider use of *C. maltaromaticum* in the dairy industry.

References

- Ardo, Y., 2006. Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotechnology Advances* 24, 238–242.
- Azuma, T., Bagenda, D.K., Yamamoto, T., Kawai, Y., Yamazaki, K., 2007. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by freeze-dried piscicocin C526 fermentate in food. *Letters in Applied Microbiology* 44, 138–144.
- Baird, R.M., Corry, J.E.L., Curtis, G.W., Mossel, D.A., Skovgaard, N., 1989. Pharmacopoeia of culture media for food microbiology-additional monographs. *International Journal of Food Microbiology* 9, 85–144.
- Barakat, R.K., Griffiths, M.W., Harris, L.J., 2000. Isolation and characterization of *Carnobacterium*, *Lactococcus*, and *Enterococcus* spp. from cooked, modified atmosphere packaged, refrigerated, poultry meat. *International Journal of Food Microbiology* 62, 83–94.
- Bhugaloo-Vial, P., Dousset, X., Metivier, A., Sorokine, O., Anglade, P., Boyaval, P., Marion, D., 1996. Purification and amino acid sequences of piscicocins V1a and V1b, two class IIa bacteriocins secreted by *Carnobacterium piscicola* V1 that display significantly different levels of specific inhibitory activity. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 4410–4416.
- Briggiler-Marco, M., Capra, M.L., Quiberoni, A., Vinderola, G., Reinheimer, J.A., Hynes, E., 2007. Nonstarter *Lactobacillus* strains as adjunct cultures for cheese making: in vitro characterization and performance in two model cheeses. *Journal of Dairy Science* 90, 4532–4542.
- Brillet, A., Pilet, M.F., Prevost, H., Bouttefroy, A., Leroi, F., 2004. Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains and application in sterile cold-smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology* 97, 1029–1037.
- Brooks, J.L., Moore, A.S., Patchett, R.A., Collins, M.D., Kroll, R.G., 1992. Use of the polymerase chain reaction and oligonucleotide probes for the rapid detection and identification of *Carnobacterium* species from meat. *The Journal of Applied Bacteriology* 72, 294–301.
- Buchanan, R.L., Bagi, L.K., 1997. Microbial competition: effect of culture conditions on the suppression of *Listeria monocytogenes* Scott A by *Carnobacterium piscicola*. *Journal of Food Protection* 60, 254–261.
- Buchanan, R.L., Klawitter, L.A., 1992a. Characterization of a lactic acid bacterium, *Carnobacterium piscicola* LK5, with activity against *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *Journal of Food Safety* 12, 199–217.
- Buchanan, R.L., Klawitter, L.A., 1992b. Effectiveness of *Carnobacterium piscicola* LK5 for controlling the growth of *Listeria monocytogenes* scott a in refrigerated foods. *Journal of Food Safety* 12, 219–236.
- Cailliez-Grimal, C., Miguindou-Mabiala, R., Leseine, M., Revol-Junelles, A.M., Millière, J.B., 2005. Quantitative polymerase chain reaction used for the rapid detection of *Carnobacterium* species from French soft cheeses. *FEMS Microbiology Letters* 250, 163–169.
- Cailliez-Grimal, C., Edima, H.C., Revol-Junelles, A.M., Millière, J.B., 2007. Short communication: *Carnobacterium maltaromaticum*: the only *Carnobacterium* species in French ripened soft cheeses as revealed by polymerase chain reaction detection. *Journal of Dairy Science* 90, 1133–1138.
- Campos, C.A., Mazzotta, A.S., Montville, T.J., 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium piscicola* in vacuum-packaged cooked chicken at refrigeration temperatures. *Journal of Food Safety* 17, 151–160.
- Chamba, J.F., 2008. Application des bactéries lactiques lors des fabrications fromagères. In: Corrieu, G., Luquet, F.M. (Eds.), *Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments*. Lavoisier, Paris, pp. 788–821.
- Chenoll, E., Macian, M.C., Aznar, R., 2003. Identification of *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Pediococcus* by rDNA-based techniques. *Systematic and Applied Microbiology* 26, 546–556.
- Chmelar, D., Matusek, A., Korgor, J., Durnova, E., Steffen, M., Chmelarova, E., 2002. Isolation of *Carnobacterium piscicola* from human pus—case report. *Folia Microbiologica* 47, 455–457.
- Collins, M.D., Farrow, J.A.E., Phillips, B.A., Ferus, S., Jones, D., 1987. Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37, 310–316.
- Connil, N., Dousset, X., Onno, B., Pilet, M.F., Breuil, M.F., Montel, M.C., 1998. Enumeration of *Carnobacterium divergens* V41, *Carnobacterium piscicola* V1 and *Lactobacillus brevis* LB62 by in situ hybridization-flow cytometry. *Letters in Applied Microbiology* 27, 302–306.
- Dalgaard, P., Vancanneyt, M., Euras Vilalta, N., Swings, J., Fruekilde, P., Leisner, J.J., 2003. Identification of lactic acid bacteria from spoilage associations of cooked and brined shrimps stored under modified atmosphere between 0 degrees C and 25 degrees C. *Journal of Applied Microbiology* 94, 80–89.
- Duffes, F., Corre, C., Leroi, F., Dousset, X., Boyaval, P., 1999a. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by in situ produced and semipurified bacteriocins of *Carnobacterium* spp. on vacuum-packed, refrigerated cold-smoked salmon. *Journal of Food Protection* 62, 1394–1403.
- Duffes, F., Leroi, F., Boyaval, P., Dousset, X., 1999b. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium* spp. strains in a simulated cold smoked fish system stored at 4 degrees C. *International Journal of Food Microbiology* 47, 33–42.
- Edima, H.C., Cailliez-Grimal, C., Revol-Junelles, A.M., Tonti, L., Linder, M., Millière, J.B., 2007. A selective enumeration medium for *Carnobacterium maltaromaticum*. *Journal of Microbiological Methods* 68, 516–521.
- Edima, H.C., Cailliez-Grimal, C., Revol-Junelles, A.M., Rondags, E., Millière, J.B., 2008. Short communication: impact of pH and temperature on the acidifying activity of *Carnobacterium maltaromaticum*. *Journal of Dairy Science* 91, 3806–3813.
- Edima, H.C., 2007. *Carnobacterium maltaromaticum*: caractéristique physiologiques et potentialités en technologie fromagère. University of Nancy.
- Emborg, J., Laursen, B.G., Rathjen, T., Dalgaard, P., 2002. Microbial spoilage and formation of biogenic amines in fresh and thawed modified atmosphere-packed salmon (*Salmo salar*) at 2 degrees C. *Journal of Applied Microbiology* 92, 790–799.
- Ercolini, D., Russo, F., Nasi, A., Ferranti, P., Villani, F., 2009. Mesophilic and psychrotrophic bacteria from meat and their spoilage potential in vitro and in beef. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 1990–2001.
- Gunasekera, T.S., Veal, D.A., Attfield, P.V., 2003. Potential for broad applications of flow cytometry and fluorescence techniques in microbiological and somatic cell analyses of milk. *International Journal of Food Microbiology* 85, 269–279.
- Gursky, L.J., Martin, N.L., Derksen, D.J., Van Belkum, M.J., Kaur, K., Vederas, J.C., Stiles, M.E., McMullen, L.M., 2006. Production of piscicocin 126 by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL26 is controlled by temperature and induction peptide concentration. *Archives of Microbiology* 186, 317–325.
- Gurtler, V., Mayall, B.C., 2001. Genetic transfer and genome evolution in MRSA. *Microbiology* 147, 3195–3197.
- Hadry, H., Balick, M., Schierwater, B., 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* 1, 55–63.
- Hammes, W.P., Hertel, C., 2006. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleiferand, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes*, Third ed. Springer-Verlag, New-York, pp. 320–403.
- Hammes, W.P., Hertel, C., 2009. *Carnobacterium*. In: Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleiferand, K.-H., Whitman, W.B. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 3. Williams and Wilkins, pp. 549–556.
- Herbin, S., Mathieu, F., Brule, F., Branlant, C., Lefebvre, G., Lebrihi, A., 1997. Characteristics and genetic determinants of bacteriocin activities produced by *Carnobacterium piscicola* CP5 isolated from cheese. *Current Microbiology* 35, 319–326.
- Holck, A.L., Axelsson, L., Schillinger, U., 1994. Purification and cloning of piscicocin 61, a bacteriocin from *Carnobacterium piscicola* LV61. *Current Microbiology* 29, 63–68.
- Holzappel, W.H., 1992. Culture media for non-sporulating gram-positive food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 17, 113–133.
- Jaffres, E., Sohier, D., Leroi, F., Pilet, M.F., Prevost, H., Joffraud, J.J., Dousset, X., 2009. Study of the bacterial ecosystem in tropical cooked and peeled shrimps using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology* 131, 20–29.
- Jensen, N.S., Stanton, T.B., 1993. Comparison of *Serpulina hyodysenteriae* B78, the type strain of the species, with other *S. hyodysenteriae* strains using enteropathogenicity studies and restriction fragment length polymorphism analysis. *Veterinary Microbiology* 36, 221–231.
- Kabadjova, P., Dousset, X., Le Cam, V., Prevost, H., 2002. Differentiation of closely related *Carnobacterium* food isolates based on 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer region polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 5358–5366.
- Kim, M.S., Roh, S.W., Nam, Y.D., Yoon, J.H., Bae, J.W., 2009. *Carnobacterium jeotgali* sp. nov., isolated from traditional fermented food in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.
- Lai, S., Manchester, L.N., 2000. Numerical phenetic study of the genus *Carnobacterium*. *Antonie van Leeuwenhoek* 78, 73–85.
- Lai, S., Goodacre, R., Manchester, L.N., 2004. Whole-organism fingerprinting of the genus *Carnobacterium* using Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). *Systematic and Applied Microbiology* 27, 186–191.
- Larrouture-Thiveyrat, C., Montel, M.C., 2003. Effects of environmental factors on leucine catabolism by *Carnobacterium piscicola*. *International Journal of Food Microbiology* 81, 177–184.
- Larrouture-Thiveyrat, C., Pepin, M., Leroy-Sétrin, S., Montel, M.C., 2003. Effect of *Carnobacterium piscicola* on aroma formation in sausage mince. *Meat Science* 63, 423–426.
- Laursen, B.G., Bay, L., Cleenwerck, I., Vancanneyt, M., Swings, J., Dalgaard, P., Leisner, J.J., 2005. *Carnobacterium divergens* and *Carnobacterium maltaromaticum* as spoilers or protective cultures in meat and seafood: phenotypic and genotypic characterization. *Systematic and Applied Microbiology* 28, 151–164.

- Laursen, B.G., Leisner, J.J., Dalgaard, P., 2006. *Carnobacterium* Species: effect of metabolic activity and interaction with *Brochothrix thermosphacta* on sensory characteristics of modified atmosphere packed shrimp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 3604–3611.
- Leisner, J.J., Laursen, B.G., Prevost, H., Drider, D., Dalgaard, P., 2007. *Carnobacterium*: positive and negative effects in the environment and in foods. *FEMS Microbiology Reviews* 31, 592–613.
- Leroi, F., Joffraud, J.J., Chevalier, F., Cardinal, M., 1998. Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8 degrees C. *International Journal of Food Microbiology* 39, 111–121.
- Loch, T.P., Xu, W., Fitzgerald, S.M., Faisal, M., 2008. Isolation of a *Carnobacterium maltaromaticum*-like bacterium from systemically infected lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *FEMS Microbiology Letters* 288, 76–84.
- Macian, M.C., Chenoll, E., Aznar, R., 2004. Simultaneous detection of *Carnobacterium* and *Leuconostoc* in meat products by multiplex PCR. *Journal of Applied Microbiology* 97, 384–394.
- Manchester, L.N., Toole, A., Goodacre, R., 1995. Characterization of *Carnobacterium* species by pyrolysis mass spectrometry. *Journal of Applied Bacteriology* 78, 88–96.
- Marley, L., Signolle, J.P., Amiel, C., Travert, J., 2001. Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Vibrational Spectroscopy* 26, 151–159.
- Marilley, L., Casey, M.G., 2004. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology* 90, 139–159.
- Martin-Visscher, L.A., van Belkum, M.J., Garneau-Tsodikova, S., Whittall, R.M., Zheng, J., McMullen, L.M., Vederas, J.C., 2008. Isolation and characterization of carnocyclin A, a novel circular bacteriocin produced by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 4756–4763.
- Masson, F., Talon, R., Montel, M.C., 1996. Histamine and tyramine production by bacteria from meat products. *International Journal of Food Microbiology* 32, 199–207.
- Mejlholm, O., Boknaes, N., Dalgaard, P., 2005. Shelf life and safety aspects of chilled cooked and peeled shrimps (*Pandalus borealis*) in modified atmosphere packaging. *Journal of Applied Microbiology* 99, 66–76.
- Mejlholm, O., Kjeldgaard, J., Modberg, A., Vest, M.B., Boknaes, N., Koort, J., Bjørkroth, J., Dalgaard, P., 2008. Microbial changes and growth of *Listeria monocytogenes* during chilled storage of brined shrimp (*Pandalus borealis*). *International Journal of Food Microbiology* 124, 250–259.
- Miller, I.A., Morgan, M.E., Libbey, L.M., 1974. *Lactobacillus maltaromicus*, a new species producing a malty aroma. *International Journal of Systematic Bacteriology* 24, 346–354.
- Millière, J.B., Lefebvre, G., 1994. *Carnobacterium piscicola*, a common species of French soft cheese from cow's raw milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 48, 19–30.
- Millière, J.B., Michel, M., Mathieu, F., Lefebvre, G., 1994. Presence of *Carnobacterium* spp. in French surface mould-ripened soft- cheese. *Journal of Applied Bacteriology* 76, 264–269.
- Mora, D., Scarpellini, M., Franzetti, L., Colombo, S., Galli, A., 2003. Reclassification of *Lactobacillus maltaromicus* (Miller et al. 1974) DSM 20342(T) and DSM 20344 and *Carnobacterium piscicola* (Collins et al. 1987) DSM 20730(T) and DSM 20722 as *Carnobacterium maltaromaticum* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 675–678.
- Morea, M., Baruzzi, F., Cocconcelli, P.S., 1999. Molecular and physiological characterization of dominant bacterial populations in traditional mozzarella cheese processing. *Journal of Applied Microbiology* 87, 574–582.
- Navarro, E., Simonet, P., Normand, P., Bardin, R., 1992. Characterization of natural populations of *Nitrobacter* spp. using PCR/RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer. *Archives of Microbiology* 157, 107–115.
- Nilsson, L., Gram, L., Huss, H.H., 1999. Growth control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora. *Journal of Food Protection* 62, 336–342.
- Nilsson, L., Ng, Y.Y., Christiansen, J.N., Jørgensen, B.L., Grotinun, D., Gram, L., 2004. The contribution of bacteriocin to inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium piscicola* strains in cold-smoked salmon systems. *Journal of Applied Microbiology* 96, 133–143.
- Nilsson, L., Hansen, T.B., Garrido, P., Buchrieser, C., Glaser, P., Knöchel, S., Gram, L., Gravesen, A., 2005. Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by a non-bacteriocinogenic *Carnobacterium piscicola*. *Journal of Applied Microbiology* 98, 172–183.
- Nissen, H., Holck, A., Dainty, R.H., 1994. Identification of *Carnobacterium* spp. and *Leuconostoc* spp. in meat by genus-specific 16S rRNA probes. *Letters in Applied Microbiology* 19, 165–168.
- Paludan-Müller, C., Dalgaard, P., Huss, H.H., Gram, L., 1998. Evaluation of the role of *Carnobacterium piscicola* in spoilage of vacuum- and modified-atmosphere-packed cold-smoked salmon stored at 5 degrees C. *International Journal of Food Microbiology* 39, 155–166.
- Pelle, E., Dousset, X., Prevost, H., Drider, D., 2005. Specific molecular detection of *Carnobacterium piscicola* SF668 in cold smoked salmon. *Letters in Applied Microbiology* 40, 364–368.
- Pot, B., 2008. The taxonomy of lactic acid bacteria. In: Corrieu, G., Luquet, F.M. (Eds.), *Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments*. Lavoisier, Paris, pp. 1–109.
- Quadri, L.E., Sailer, M., Roy, K.L., Vederas, J.C., Stiles, M.E., 1994. Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. *Journal of Biological Chemistry* 269, 12204–12211.
- Rachman, C., Kabadjova, P., Valcheva, R., Prevost, H., Dousset, X., 2004. Identification of *Carnobacterium* species by restriction fragment length polymorphism of the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region and species-specific PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 4468–4477.
- Ruiz, P., Izquierdo, P.M., Sesena, S., Palop, M.L., 2008. Intraspecific genetic diversity of lactic acid bacteria from malolactic fermentation of Cencibel wines as derived from combined analysis of RAPD-PCR and PFGE patterns. *Food Microbiology* 25, 942–948.
- Scarpellini, M., Mora, D., Colombo, S., Franzetti, L., 2002. Development of genus/species-specific PCR analysis for identification of *Carnobacterium* strains. *Current Microbiology* 45, 24–29.
- Schirmer, B.C., Heir, E., Langsrud, S., 2009. Characterization of the bacterial spoilage flora in marinated pork products. *Journal of Applied Microbiology* 106, 2106–2116.
- Schöbitz, R., Suazo, V., Costa, M., Ciampi, L., 2003. Effects of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Carnobacterium piscicola* against human and salmon isolates of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 84, 237–244.
- Schöbitz, R.P., Boćrquez, P.A., Costa, M.E., Ciampi, L.R., Brito, C.S., 2006. Bacteriocin like substance production by *Carnobacterium piscicola* in a continuous system with three culture broths. Study of antagonism against *Listeria monocytogenes* on vacuum packaged salmon. *Brazilian Journal of Microbiology* 37, 52–57.
- Seppola, M., Olsen, R.E., Sandaker, E., Kanapathipillai, P., Holzapfel, W.H., Ringo, E., 2006. Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) typing of carnobacteria isolated from hindgut chamber and large intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Systematic and Applied Microbiology* 29, 131–137.
- Smit, B.A., Engels, W.J., Wouters, J.T., Smit, G., 2004. Diversity of L-leucine catabolism in various microorganisms involved in dairy fermentations, and identification of the rate-controlling step in the formation of the potent flavour component 3-methylbutanal. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64, 396–402.
- Smit, G., Smit, B.A., Engels, W.J., 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 591–610.
- Thierry, A., Maillard, M.B., 2002. Production of cheese flavour compounds derived from amino acid catabolism by *Propionibacterium freudenreichii*. *Lait* 82, 17–32.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., Swings, J., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews* 60, 407–438.
- Vihavainen, E., Lundström, H.S., Susiluoto, T., Koort, J., Paulin, L., Auvinen, P., Bjørkroth, K.J., 2007. Role of broiler carcasses and processing plant air in contamination of modified-atmosphere-packaged broiler products with psychrotrophic lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 1136–1145.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23, 4407–4414.
- Wallbanks, S., Martínez-Murcia, A.J., Fryer, J.L., Phillips, B.A., Collins, M.D., 1990. 16S rRNA sequence determination for members of the genus *Carnobacterium* and related lactic acid bacteria and description of *Vagococcus salmoninarum* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 40, 224–230.
- Wan, K., Harmark, J., Davidson, B.E., Hillier, A.J., Gordon, J.B., Wilcock, A., Hickey, M.W., Coventry, M.J., 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by piscicolin 126 in milk and Camembert cheese manufactured with a thermophilic starter. *Journal of Applied Microbiology* 82, 273–280.
- Wasney, M.A., Holley, R.A., Jayas, D.S., 2001. Cresol red thallium acetate sucrose inulin (CTSI) agar for the selective recovery of *Carnobacterium* spp. *International Journal of Food Microbiology* 64, 167–174.
- Worobo, R.W., Henkel, T., Sailer, M., Roy, K.L., Vederas, J.C., Stiles, M.E., 1994. Characteristics and genetic determinant of a hydrophobic peptide bacteriocin, carnobacteriocin A, produced by *Carnobacterium piscicola* LV17A. *Microbiology* 140 (Pt 3), 517–526.
- Yamazaki, K., Suzuki, M., Kawai, Y., Inoue, N., Montville, T.J., 2003. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon by *Carnobacterium piscicola* CS526 isolated from frozen surimi. *Journal of Food Protection* 66, 1420–1425.
- Yamazaki, K., Suzuki, M., Kawai, Y., Inoue, N., Montville, T.J., 2005. Purification and characterization of a novel class IIa bacteriocin, pisciocin CS526, from surimi-associated *Carnobacterium piscicola* CS526. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 554–557.
- Yost, C.K., Nattress, F.M., 2000. The use of multiplex PCR reactions to characterize populations of lactic acid bacteria associated with meat spoilage. *Letters in Applied Microbiology* 31, 129–133.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

van der Aa B.C., Asther M. & Dufrene Y.F. (2002). Surface properties of *Aspergillus oryzae* spores investigated by atomic force microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **24**, 277-284.

Abriouel, Sánchez-González, Maqueda, Gálvez, Valdivia & José Gálvez-Ruiz M. (2001). Monolayer Characteristics of Bacteriocin AS-48, pH Effect and Interactions with Dipalmitoyl Phosphatidic Acid at the Air-Water Interface. *J Colloid Interface Sci* **233**, 306-312.

Adams, M. R. (1999). Safety of industrial lactic acid bacteria. *J Biotechnol* **68**, 171-178.

Ahmad, S. & Sarai, A. (2005). PSSM-based prediction of DNA binding sites in proteins. *BMC Bioinformatics* **6**, 33.

Al-Qadiri, H. M., Al-Alami, N. I., Lin, M., Al-Holy, M., Cavinato, A. G. & Rasco, B. A. (2008). Studying of the bacterial growth phases using fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* **16**, 73-89.

Alves, C. S., Melo, M. N., Franquelim, H. G., Ferre, R., Planas, M., Feliu, L., Bardaji, E., Kowalczyk, W., Andreu, D., & other authors. (2010). *Escherichia coli* cell surface perturbation and disruption induced by antimicrobial peptides, BP100 and pepR. *J Biol Chem*.

Arihara, K., Ogihara, S., Mukai, T., Itoh, M. & Kondo, Y. (1996). Salivacin 140, a novel bacteriocin from *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* T140 active against pathogenic bacteria. *Lett Appl Microbiol* **22**, 420-424.

Aucher, W., Lacombe, C., Héquet, A., Frère, J. & Berjeaud, J.-M. (2005). Influence of amino acid substitutions in the leader peptide on maturation and secretion of mesentericin Y105 by *Leuconostoc mesenteroides*. *J Bacteriol* **187**, 2218-2223.

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

Aykroyd H. (1961). Progress in meeting protein needs of infants and preschool children. National Academies.

Azuma, T., Bagenda, D. K., Yamamoto, T., Kawai, Y. & Yamazaki, K. (2007). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by freeze-dried piscicocin CS526 fermentate in food. *Lett Appl Microbiol* **44**, 138-144.

Beganović, J., Pavunc, A. L., Gjuračić, K., Spoljarec, M., Sušković, J. & Kos, B. (2011). Improved sauerkraut production with probiotic strain *Lactobacillus plantarum* L4 and *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954. *J Food Sci* **76**, M124-129.

van Belkum, M. J. & Stiles, M. E. (1995). Molecular characterization of genes involved in the production of the bacteriocin leucocin A from *Leuconostoc gelidum*. *Appl Environ Microbiol* **61**, 3573-3579.

Bellon-Fontaine, M.-N., Rault, J. & Van Oss, C. J. (1996). Microbial adhesion to solvents: A novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **7**, 47-53.

Benchimol, E. I. & Mack, D. R. (2004). Probiotics in relapsing and chronic diarrhea. *J Pediatr*

Hematol Oncol **26**, 515-517.

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

Berney, M., Hammes, F., Bosshard, F., Weilenmann, H.-U. & Egli, T. (2007). Assessment and Interpretation of Bacterial Viability by Using the LIVE/DEAD BacLight Kit in Combination with Flow Cytometry. *Appl Environ Microbiol* **73**, 3283-3290.

Beukes, M. & Hastings, J. W. (2001). Self-protection against cell wall hydrolysis in *Streptococcus milleri* NMSCC 061 and analysis of the millericin B operon. *Appl Environ Microbiol* **67**, 3888-3896.

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

Bhugaloo-Vial, P., Douliez, J.-P., Mollé, D., Dousset, X., Boyaval, P. & Marion, D. (1999). Delineation of Key Amino Acid Side Chains and Peptide Domains for Antimicrobial Properties of Divercin V41, a Pediocin-Like Bacteriocin Secreted by *Carnobacterium divergens* V41. *Appl Environ Microbiol* **65**, 2895-2900.

Biet, F., Berjeaud, J. M., Worobo, R. W., Cenatiempo, Y. & Fremaux, C. (1998). Heterologous expression of the bacteriocin mesentericin Y105 using the dedicated transport system and the general secretion pathway. *Microbiology (Reading, Engl)* **144** (Pt 10), 2845-2854.

Binnig, Quate & Gerber. (1986). Atomic force microscope. *Phys Rev Lett* **56**, 930-933.

Bisbiroulas, P., Psylou, M., Iliopoulou, I., Diakogiannis, I., Berberi, A. & Mastronicolis, S. K. (2011). Adaptational changes in cellular phospholipids and fatty acid composition of the food pathogen *Listeria monocytogenes* as a stress response to disinfectant sanitizer benzalkonium chloride. *Lett Appl Microbiol*.

Blom, H., Katla, T., Hagen, B. F. & Axelsson, L. (1997). A model assay to demonstrate how intrinsic factors affect diffusion of bacteriocins. *Int J Food Microbiol* **38**, 103-109.

Bokas, D., Uy, D., Grattepanche, F., Duportail, G., Guedon, E., Delaunay, S. & Goergen, J.-L. (2007). Cell envelope fluidity modification for an effective glutamate excretion in *Corynebacterium glutamicum* 2262. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**, 773-781.

Bonev, B., Hooper, J. & Parisot, J. (2008). Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *J Antimicrob Chemother* **61**, 1295-1301.

Bonnell, D. (2000). *Scanning probe microscopy and spectroscopy, theory, techniques and applications.*, 2nd edn. New York J. Wiley.

Borch, E. & Molin, G. (1988). Numerical taxonomy of psychrotrophic lactic acid bacteria from prepacked meat and meat products. *Antonie Van Leeuwenhoek* **54**, 301-323.

Braegger, C., Chmielewska, A., Decsi, T., Kolacek, S., Mihatsch, W., Moreno, L., Pieścik, M., Puntis, J., Shamir, R., & other authors. (2011). Supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics: a systematic review and comment by the ESPGHAN committee on nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **52**, 238-250.

Braga, P. C. & Ricci, D. (1998). Atomic Force Microscopy: Application to Investigation of *Escherichia coli* Morphology before and after Exposure to Cefodizime. *Antimicrob Agents Chemother*

42, 18-22.

Brillet, A., Pilet, M.-F., Prevost, H., Bouttefroy, A. & Leroi, F. (2004). Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains and application in sterile cold-smoked salmon. *J Appl Microbiol* **97**, 1029-1037.

Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Micro* **3**, 238-250.

Buchanan, R. L. & Klawitter, L. A. (1991a). Effectiveness of *Carnobacterium piscicola* LK5 for controlling the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A in refrigerated foods. *J Food Safety* **12**, 219-236.

Buchanan, R. L. & Klawitter, L. A. (1991b). Characterization of a lactic acid bacterium, *Carnobacterium piscicola* LK5, with activity against *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperature. *J Food Safety* **12**, 199-217.

Bukhtiyarova, M., Yang, R. & Ray, B. (1994). Analysis of the pediocin AcH gene cluster from plasmid pSMB74 and its expression in a pediocin-negative *Pediococcus acidilactici* strain. *Appl Environ Microbiol* **60**, 3405-3408.

Burnham, N. A., Chen, X., Hodges, C. S., Matei, G. A., Thoreson, E. J., Roberts, C. J., Davies, M. C. & Tendler, S. J. B. (2003). Comparison of calibration methods for atomic-force microscopy cantilevers. *Nanotechnology* **14**, 1-6.

Bustamante & Keller. (1995). Scanning force microscopy in biology. *Phys Today* 32-38.

Di Cagno, R., Minervini, G., Rizzello, C. G., De Angelis, M. & Gobbetti, M. (2011). Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothies. *Food Microbiol* **28**, 1062-1071.

Cailliez-Grimal, C., Miguindou-Mabiala, R., Leseine, M., Revol-Junelles, A.-M. & Millière, J.-B. (2005). Quantitative polymerase chain reaction used for the rapid detection of *Carnobacterium* species from French soft cheeses. *FEMS Microbiol Lett* **250**, 163-169.

Calvez, S., Kohler, A., Prévost, H., Møretrø, T. & Drider, D. (2010). Physiological and Structural Differences Between *Enterococcus faecalis* JH2-2 and Mutant Strains Resistant to (P)-Divercin RV41. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* **2**, 226-232.

Calvez, S., Rince, A., Auffray, Y., Prevost, H. & Drider, D. (2007). Identification of new genes associated with intermediate resistance of *Enterococcus faecalis* to divercin V41, a pediocin-like bacteriocin. *Microbiol* **153**, 1609-1618.

Campos, C. A., Mazzotta, A. S. & Montville, T. J. (1997). INHIBITION OF LISTERIA MONOCYTOGENES BY CARNOBACTERIUM PISCICOLA IN VACUUM-PACKAGED COOKED CHICKEN AT REFRIGERATION TEMPERATURES. *J Food Safety* **17**, 151-160.

Carbonaro, M. & Nucara, A. (2009). Secondary structure of food proteins by Fourier transform spectroscopy in the mid-infrared region. *Amino Acids* **38**, 679-690.

Castano, S., Desbat, B., Delfour, A., Dumas, J. M., da Silva, A. & Dufourcq, J. (2005). Study of structure and orientation of mesentericin Y105, a bacteriocin from Gram-positive *Leuconostoc mesenteroides*, and its Trp-substituted analogues in phospholipid environments. *Biochim Biophys Acta* **1668**, 87-98.

Castro, F. D., Sedman, J., Ismail, A. A., Asadishad, B. & Tufenkji, N. (2010). Effect of dissolved oxygen on two bacterial pathogens examined using ATR-FTIR spectroscopy, microelectrophoresis, and potentiometric titration. *Environ Sci Technol* **44**, 4136-4141.

- Chen, Y., Ludescher, R. D. & Montville, T. J. (1997a).** Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. *Appl Environ Microbiol* **63**, 4770-4777.
- Chen, Y., Shapira, R., Eisenstein, M. & Montville, T. J. (1997b).** Functional characterization of pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a predicted tertiary structure. *Appl Environ Microbiol* **63**, 524-531.
- Chen, Y., Ludescher, R. D. & Montville, T. J. (1998).** Influence of Lipid Composition on Pediocin PA-1 Binding to Phospholipid Vesicles. *Appl Environ Microbiol* **64**, 3530-3532.
- Chikindas, M. L., García-Garcera, M. J., Driessen, A. J., Ledeboer, A. M., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., Abee, T., Konings, W. N. & Venema, G. (1993).** Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Appl Environ Microbiol* **59**, 3577-3584.
- Christensen, D. P. & Hutkins, R. W. (1992).** Collapse of the proton motive force in *Listeria monocytogenes* caused by a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Appl Environ Microbiol* **58**, 3312-3315.
- Cintas, L. M., Casaus, P., Håvarstein, L. S., Hernández, P. E. & Nes, I. F. (1997).** Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl Environ Microbiol* **63**, 4321-4330.
- Cleveland, J. P., Manne, S., Bocek, D. & Hansma, P. K. (1993).** A nondestructive method for determining the spring constant of cantilevers for scanning force microscopy. *Rev Sci Instrum* **64**, 403.
- Cocolin, L. & Rantsiou, K. (2007).** Sequencing and expression analysis of sakacin genes in *Lactobacillus curvatus* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**, 1403-1411.
- Collins, M. D., Farrow, J. A. E., Phillips, B. A., Ferusu, S. & Jones, D. (1987).** Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and Some Catalase-Negative, Asporogenous, Rod-Shaped Bacteria from Poultry in a New Genus, *Carnobacterium*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**, 310 -316.
- Cotter, P. D., Hill, C. & Ross, R. P. (2005).** Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol* **3**, 777-788.
- Crichton, G. E., Bryan, J., Buckley, J. & Murphy, K. J. (2011).** Dairy consumption and metabolic syndrome: a systematic review of findings and methodological issues. *Obes Rev* **12**, e190-201.
- Di Criscio, T., Fratianni, A., Mignogna, R., Cinquanta, L., Coppola, R., Sorrentino, E. & Panfili, G. (2010).** Production of functional probiotic, prebiotic, and synbiotic ice creams. *J Dairy Sci* **93**, 4555-4564.
- Cronk, T. C., Steinkraus, K. H., Hackler, L. R. & Mattick, L. R. (1977).** Indonesian tapé ketan fermentation. *Appl Environ Microbiol* **33**, 1067-1073.
- Dague, E., Duval, J., Jorand, F., Thomas, F. & Gaboriaud, F. (2006).** Probing Surface Structures of *Shewanella* spp. by Microelectrophoresis. *Biophys J* **90**, 2612-2621.
- Dalet, K., Cenatiempo, Y., Cossart, P. & Héchard, Y. (2001).** A sigma(54)-dependent PTS permease of the mannose family is responsible for sensitivity of *Listeria monocytogenes* to mesentericin Y105. *Microbiology (Reading, Engl)* **147**, 3263-3269.
- Dalhus, B., Johnsen, L. & Nissen-Meyer, J. (2003).** Crystallization and preliminary X-ray data investigation of the bacterial enterocin A immunity protein at 1.65 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **59**, 1291-1293.

- Davidson, P.M. (1997).** Chemical conservatives and natural antimicrobial compounds. In *Food Microbiology: fundamentals and frontiers*, ASM Press., pp. 520-556. Doyle M.P., Beuchat L.R., Montville T.J.
- Dayem, M. A., Fleury, Y., Devilliers, G., Chaboisseau, E., Girard, R., Nicolas, P. & Delfour, A. (1996).** The putative immunity protein of the gram-positive bacteria *Leuconostoc mesenteroides* is preferentially located in the cytoplasm compartment. *FEMS Microbiol Lett* **138**, 251-259.
- Deléage, G. & Geourjon, C. (1993).** An interactive graphic program for calculating the secondary structure content of proteins from circular dichroism spectrum. *Comput Appl Biosci* **9**, 197-199.
- Denich, T. J., Beaudette, L. A., Lee, H. & Trevors, J. T. (2003).** Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *J Microbiol Methods* **52**, 149-182.
- Diep, D. B., Axelsson, L., Grefslis, C. & Nes, I. F. (2000).** The synthesis of the bacteriocin sakacin A is a temperature-sensitive process regulated by a pheromone peptide through a three-component regulatory system. *Microbiology (Reading, Engl)* **146 (Pt 9)**, 2155-2160.
- Diep, D. B. & Nes, I. F. (2002).** Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Curr Drug Targets* **3**, 107-122.
- Diep, D. B., Skaugen, M., Salehian, Z., Holo, H. & Nes, I. F. (2007).** Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 2384-2389.
- Doktycz, M. J., Sullivan, C. J., Hoyt, P. R., Pelletier, D. A., Wu, S. & Allison, D. P. (2003).** AFM imaging of bacteria in liquid media immobilized on gelatin coated mica surfaces. *Ultramicroscopy* **97**, 209-216.
- Dorobantu, L. S., Bhattacharjee, S., Foght, J. M. & Gray, M. R. (2008).** Atomic force microscopy measurement of heterogeneity in bacterial surface hydrophobicity. *Langmuir* **24**, 4944-4951.
- Drider, D., Fimland, G., Héchar, Y., McMullen, L. M. & Prévost, H. (2006).** The Continuing Story of Class IIa Bacteriocins. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 564-582.
- Duffes, F., Leroi, F., Boyaval, P. & Dousset, X. (1999a).** Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium* spp. strains in a simulated cold smoked fish system stored at 4 degrees C. *Int J Food Microbiol* **47**, 33-42.
- Duffes, F., Corre, C., Leroi, F., Dousset, X. & Boyaval, P. (1999b).** Inhibition of *Listeria monocytogenes* by in situ produced and semipurified bacteriocins of *Carnobacterium* spp. on vacuum-packed, refrigerated cold-smoked salmon. *J Food Prot* **62**, 1394-1403.
- Dufrêne, Y. F. (2002).** Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology. *J Bacteriol* **184**, 5205-5213.
- Dufrêne, Y. F. & Hinterdorfer, P. (2008).** Recent progress in AFM molecular recognition studies. *Pflugers Arch* **456**, 237-245.
- Duval, J. F. L., Leermakers, F. A. M. & van Leeuwen, H. P. (2004).** Electrostatic interactions between double layers: influence of surface roughness, regulation, and chemical heterogeneities. *Langmuir* **20**, 5052-5065.
- Duval, J. F. L. & Gaboriaud, F. (2010).** Progress in electrohydrodynamics of soft microbial particle interphases. *Curr Opin Colloid In* **15**, 184-195.
- Duval, J. F. L. & Ohshima, H. (2006).** Electrophoresis of diffuse soft particles. *Langmuir* **22**, 3533-3546.

- Duval, J. F. L., Busscher, H. J., van de Belt-Gritter, B., van der Mei, H. C. & Norde, W. (2005).** Analysis of the interfacial properties of fibrillated and nonfibrillated oral streptococcal strains from electrophoretic mobility and titration measurements: evidence for the shortcomings of the “classical soft-particle approach.” *Langmuir* **21**, 11268-11282.
- Duval, J. F. L., Merlin, J. & Narayana, P. A. L. (2011).** Electrostatic interactions between diffuse soft multi-layered (bio)particles: beyond Debye-Hückel approximation and Deryagin formulation. *Phys Chem Chem Phys* **13**, 1037-1053.
- Ede, S. M., Hafner, L. M. & Fredericks, P. M. (2004).** Structural changes in the cells of some bacteria during population growth: a Fourier transform infrared-attenuated total reflectance study. *Appl Spectrosc* **58**, 317-322.
- Emborg, J., Laursen, B. G., Rathjen, T. & Dalgaard, P. (2002).** Microbial spoilage and formation of biogenic amines in fresh and thawed modified atmosphere-packed salmon (*Salmo salar*) at 2 degrees C. *J Appl Microbiol* **92**, 790-799.
- Ennahar, S., Sonomoto, K. & Ishizaki, A. (1999).** Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. *J Biosci Bioeng* **87**, 705-716.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K. & Ishizaki, A. (2000).** Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews* **24**, 85-106.
- Ercolini, D., Storia, A., Villani, F. & Mauriello, G. (2006).** Effect of a bacteriocin-activated polythene film on *Listeria monocytogenes* as evaluated by viable staining and epifluorescence microscopy. *J Appl Microbiol* **100**, 765-772.
- Ercolini, D., Russo, F., Nasi, A., Ferranti, P. & Villani, F. (2009).** Mesophilic and psychrotrophic bacteria from meat and their spoilage potential in vitro and in beef. *Appl Environ Microbiol* **75**, 1990-2001.
- Fabretti, F., Theilacker, C., Baldassarri, L., Kaczynski, Z., Kropec, A., Holst, O. & Huebner, J. (2006).** Alanine Esters of Enterococcal Lipoteichoic Acid Play a Role in Biofilm Formation and Resistance to Antimicrobial Peptides. *Infect Immun* **74**, 4164-4171.
- Fadda, S., López, C. & Vignolo, G. (2010).** Role of lactic acid bacteria during meat conditioning and fermentation: peptides generated as sensorial and hygienic biomarkers. *Meat Sci* **86**, 66-79.
- Falconer, R. J. & Collins, B. M. (2011).** Survey of the year 2009: applications of isothermal titration calorimetry. *J Mol Recognit* **24**, 1-16.
- Feng, G., Guron, G. K. P., Churey, J. J. & Worobo, R. W. (2009).** Characterization of Mundticin L, a Class IIa Anti-*Listeria* Bacteriocin from *Enterococcus mundtii* CUGF08. *Appl Environ Microbiol* **75**, 5708-5713.
- Fimland, G., Blingsmo, O. R., Sletten, K., Jung, G., Nes, I. F. & Nissen-Meyer, J. (1996).** 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**, 3313-3318.
- Fimland, G., Johnsen, L., Axelsson, L., Brurberg, M. B., Nes, I. F., Eijsink, V. G. & Nissen-Meyer, J. (2000).** A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. *J Bacteriol* **182**, 2643-2648.
- Fimland, G., Johnsen, L., Dalhus, B. & Nissen-Meyer, J. (2005).** Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. *J Pept Sci* **11**, 688-696.

- Firtel, M., Henderson, G. & Sokolov, I. (2004).** Nanosurgery: observation of peptidoglycan strands in *Lactobacillus helveticus* cell walls. *Ultramicroscopy* **101**, 105-109.
- Fleury, Y., Dayem, M. A., Montagne, J. J., Chaboisseau, E., Le Caer, J. P., Nicolas, P. & Delfour, A. (1996).** Covalent structure, synthesis, and structure-function studies of mesentericin Y 105(37), a defensive peptide from gram-positive bacteria *Leuconostoc mesenteroides*. *J Biol Chem* **271**, 14421-14429.
- Francius, G., Domenech, O., Mingeot-Leclercq, M. P. & Dufrêne, Y. F. (2008).** Direct Observation of *Staphylococcus aureus* Cell Wall Digestion by Lysostaphin. *J Bacteriol* **190**, 7904-7909.
- Francius, G., Polyakov, P., Merlin, J., Abe, Y., Ghigo, J.-M., Merlin, C., Beloin, C. & Duval, J. F. L. (2011).** Bacterial Surface Appendages Strongly Impact Nanomechanical and Electrokinetic Properties of *Escherichia coli* Cells Subjected to Osmotic Stress. *PLoS One* **6**.
- Franke, C. M., Tiemersma, J., Venema, G. & Kok, J. (1999).** Membrane topology of the lactococcal bacteriocin ATP-binding cassette transporter protein LcnC. Involvement of LcnC in lactococcal maturation. *J Biol Chem* **274**, 8484-8490.
- Fregeau Gallagher, N. L., Sailer, M., Niemczura, W. P., Nakashima, T. T., Stiles, M. E. & Vederas, J. C. (1997).** Three-dimensional structure of leucocin A in trifluoroethanol and dodecylphosphocholine micelles: spatial location of residues critical for biological activity in type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biochemistry* **36**, 15062-15072.
- Fremaux, C., Héchard, Y. & Cenatiempo, Y. (1995).** Mesentericin Y105 gene clusters in *Leuconostoc mesenteroides* Y105. *Microbiology (Reading, Engl)* **141** (Pt 7), 1637-1645.
- Frisbie, C. D., Rozsnyai, L. F., Noy, A., Wrighton, M. S. & Lieber, C. M. (1994).** Functional Group Imaging by Chemical Force Microscopy. *Science* **265**, 2071 -2074.
- Förch, R., Schönherr, H. & Jenkins, A. T. A. (2009).** Surface design: applications in bioscience and nanotechnology. Wiley-VCH.
- Gaboriaud, F., Dague, E., Bailet, S., Jorand, F., Duval, J. & Thomas, F. (2006).** Multiscale dynamics of the cell envelope of *Shewanella putrefaciens* as a response to pH change. *Colloids Surf B* **52**, 108-116.
- Gosselin, F., Duval, J. F. L., Simonet, J., Ginevra, C., Gaboriaud, F., Jarraud, S. & Mathieu, L. (2011).** Impact of the virulence-associated MAb3/1 epitope on the physicochemical surface properties of *Legionella pneumophila* sg1: An issue to explain infection potential? *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **82**, 283-290.
- Gursky, L. J., Martin, N. I., Derksen, D. J., van Belkum, M. J., Kaur, K., Vederas, J. C., Stiles, M. E. & McMullen, L. M. (2006).** Production of piscicolin 126 by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL26 is controlled by temperature and induction peptide concentration. *Arch Microbiol* **186**, 317-325.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L. & Ben Omar, N. (2007).** Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int J Food Microbiol* **120**, 51-70.
- Gänzle, M. G., Weber, S. & Hammes, W. P. (1999).** Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. *Int J Food Microbiol* **46**, 207-217.
- Haakensen, M., Vickers, D. M. & Ziola, B. (2009).** Susceptibility of *Pediococcus* isolates to antimicrobial compounds in relation to hop-resistance and beer-spoilage. *BMC Microbiol* **9**, 190.
- Habash, M. B., van der Mei, H. C., Reid, G. & Busscher, H. J. (1997).** Adhesion of *Pseudomonas*

aeruginosa to silicone rubber in a parallel plate flow chamber in the absence and presence of nutrient broth. *Microbiology (Reading, Engl)* **143 (Pt 8)**, 2569-2574.

Hamadi, F. & Latrache, H. (2008). Comparison of contact angle measurement and microbial adhesion to solvents for assaying electron donor-electron acceptor (acid-base) properties of bacterial surface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **65**, 134-139.

Hammes, W. P. & Hertel, C. (2006). The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In *The Prokaryotes, Third ed*, Springer-Verlag., pp. 320-403. New-York

Hammes, W. P. & Hertel, C. (2009). *Carnobacterium*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol 3*, Williams and Wilkins., pp. 549-556. Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleiferand, K.-H., Whitman, W.B.

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

Haugen, H. S., Fimland, G. & Nissen-Meyer, J. (2011). Mutational analysis of residues in the helical region of the class IIa bacteriocin pediocin PA-1. *Applied and Environmental Microbiology* **77**, 1966-1972.

Helenius, J., Heisenberg, C.-P., Gaub, H. E. & Muller, D. J. (2008). Single-cell force spectroscopy. *Journal of Cell Science* **121**, 1785 -1791.

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

Herranz, C., Cintas, L. M., Hernández, P. E., Moll, G. N. & Driessen, A. J. M. (2001). Enterocin P Causes Potassium Ion Efflux from *Enterococcus faecium* T136 Cells. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 901-904.

Hoh, J. H., Cleveland, J. P., Prater, C. B., Revel, J. P. & Hansma, P. K. (2011). Quantized adhesion detected with the atomic force microscope. *J Am Chem Soc* **114**, 4917-4918.

Holck, A. L., Axelsson, L. & Schillinger, U. (1994). Purification and cloning of piscicolin 61, a bacteriocin from *Carnobacterium piscicola* LV61. *Curr Microbiol* **29**, 63-68.

Holzappel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J. & Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr* **73**, 365S-373S.

Hooper, L. V., Wong, M. H., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P. G. & Gordon, J. I. (2001). Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* **291**, 881-884.

Housden, N. G. & Kleanthous, C. (2011). Thermodynamic dissection of colicin interactions. *Meth Enzymol* **488**, 123-145.

Huot, E., Barrena-Gonzalez, C. & Petitdemange, H. (1996). Comparative effectiveness of nisin and bacteriocin J46 at different pH values. *Lett Appl Microbiol* **22**, 76-79.

Hutter, J. L. & Bechhoefer, J. (1993). Calibration of atomic-force microscope tips. *Rev Sci Instrum* **64**, 1868.

Håvarstein, L. S., Diep, D. B. & Nes, I. F. (1995). A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol Microbiol* **16**, 229-240.

Héchar, Y., Pelletier, C., Cenatiempo, Y. & Frère, J. (2001). Analysis of sigma(54)-dependent

genes in *Enterococcus faecalis*: a mannose PTS permease (EII(Man)) is involved in sensitivity to a bacteriocin, mesentericin Y105. *Microbiology* **147**, 1575-1580.

Isolauri, E., Arvola, T., Sütas, Y., Moilanen, E. & Salminen, S. (2000). Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin Exp Allergy* **30**, 1604-1610.

Ivanov, I. E., Kintz, E. N., Porter, L. A., Goldberg, J. B., Burnham, N. A. & Camesano, T. A. (2011). Relating the physical properties of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharides to virulence by atomic force microscopy. *J Bacteriol* **193**, 1259-1266.

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

Jack, R. W., Wan, J., Gordon, J., Harmark, K., Davidson, B. E., Hillier, A. J., Wettenhall, R. E., Hickey, M. W. & Coventry, M. J. (1996). Characterization of the chemical and antimicrobial properties of piscicolin 126, a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* JG126. *Appl Environ Microbiol* **62**, 2897-2903.

Jacobs, A. & Chenia, H. Y. (2011). Biofilm formation and adherence characteristics of an *Elizabethkingia meningoseptica* isolate from *Oreochromis mossambicus*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **10**, 16.

Jaffrès, E., Sohier, D., Leroi, F., Pilet, M. F., Prévost, H., Joffraud, J. J. & Dousset, X. (2009). Study of the bacterial ecosystem in tropical cooked and peeled shrimps using a polyphasic approach. *Int J Food Microbiol* **131**, 20-29.

Jasniewski, J., Cailliez-Grimal, C., Younsi, M., Millière, J.-B. & Revol-Junelles, A.-M. (2008a). Fluorescence anisotropy analysis of the mechanism of action of mesentericin 52A: speculations on antimicrobial mechanism. *Appl Microbiol Biotechnol* **81**, 339-347.

Jasniewski, J., Cailliez-Grimal, C., Younsi, M., Millière, J.-B. & Revol-Junelles, A.-M. (2008b). Functional differences in *Leuconostoc* sensitive and resistant strains to mesentericin 52A, a class IIa bacteriocin. *FEMS Microbiol Lett* **289**, 193-201.

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

Jasniewski, J., Cailliez-Grimal, C., Chevalot, I., Millière, J.-B. & Revol-Junelles, A.-M. (2009). Interactions between two carnobacteriocins Cbn BM1 and Cbn B2 from *Carnobacterium maltaromaticum* CP5 on target bacteria and Caco-2 cells. *Food Chem Toxicol*.

Jelliffe, D. B. (1968). Infant nutrition in the subtropics and tropics. *Monogr Ser World Health Organ* **29**, 1-335.

Joerger, M. C. & Klaenhammer, T. R. (1990). Cloning, expression, and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 481 gene encoding the bacteriocin helveticin J. *J Bacteriol* **172**, 6339-6347.

Johnsen, L., Fimland, G., Eijsink, V. & Nissen-Meyer, J. (2000). Engineering increased stability in the antimicrobial peptide pediocin PA-1. *Appl Environ Microbiol* **66**, 4798-4802.

Johnsen, L., Fimland, G., Mantzilas, D. & Nissen-Meyer, J. (2004). Structure-function analysis of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins: C-terminal parts of immunity proteins are involved in specific recognition of cognate bacteriocins. *Appl Environ Microbiol* **70**, 2647-2652.

Johnsen, L., Dalhus, B., Leiros, I. & Nissen-Meyer, J. (2005). 1.6-Angstroms crystal structure of EntA-im. A bacterial immunity protein conferring immunity to the antimicrobial activity of the

pediocin-like bacteriocin enterocin A. *J Biol Chem* **280**, 19045-19050.

Jolliffe, I. (2002). *Principal component analysis*, 2nd edn. New York: Springer.

Joosten, H. M., Nunez, M., Devreese, B., Van Beeumen, J. & Marugg, J. D. (1996). Purification and characterization of enterocin 4, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* INIA 4. *Appl Environ Microbiol* **62**, 4220-4223.

Jucker, B. A., Harms, H. & Zehnder, A. J. (1996). Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* 70401 to glass and Teflon. *J Bacteriol* **178**, 5472-5479.

Kailas, L., Ratcliffe, E. C., Hayhurst, E. J., Walker, M. G., Foster, S. J. & Hobbs, J. K. (2009). Immobilizing live bacteria for AFM imaging of cellular processes. *Ultramicroscopy* **109**, 775-780.

Kaiser, A. L. & Montville, T. J. (1996). Purification of the bacteriocin bavaricin MN and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipid vesicles. *Appl Environ Microbiol* **62**, 4529-4535.

Kanatani, K., Oshimura, M. & Sano, K. (1995). Isolation and characterization of acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol* **61**, 1061-1067.

Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **49**, 209-224.

Kaur, K., Andrew, L. C., Wishart, D. S. & Vederas, J. C. (2004). Dynamic relationships among type IIa bacteriocins: temperature effects on antimicrobial activity and on structure of the C-terminal amphipathic alpha helix as a receptor-binding region. *Biochemistry* **43**, 9009-9020.

Kawamoto, S., Shima, J., Sato, R., Eguchi, T., Ohmomo, S., Shibato, J., Horikoshi, N., Takeshita, K. & Sameshima, T. (2002). Biochemical and genetic characterization of mundticin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7393. *Appl Environ Microbiol* **68**, 3830-3840.

Kazazic, M., Nissen-Meyer, J. & Fimland, G. (2002). Mutational analysis of the role of charged residues in target-cell binding, potency and specificity of the pediocin-like bacteriocin sakacin P. *Microbiology* **148**, 2019-2027.

Kiers, P. J., Bos, R., van der Mei, H. C. & Busscher, H. J. (2001). The electrophoretic softness of the surface of *Staphylococcus epidermidis* cells grown in a liquid medium and on a solid agar. *Microbiology (Reading, Engl)* **147**, 757-762.

Kim, M.-S., Roh, S. W., Nam, Y.-D., Yoon, J.-H. & Bae, J.-W. (2009). *Carnobacterium jeotgali* sp. nov., isolated from a Korean traditional fermented food. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 3168-3171.

Kjos, M., Nes, I. F. & Diep, D. B. (2009). Class II one-peptide bacteriocins target a phylogenetically defined subgroup of mannose phosphotransferase systems on sensitive cells. *Microbiology* **155**, 2949 - 2961.

Kjos, M., Salehian, Z., Nes, I. F. & Diep, D. B. (2010). An extracellular loop of the mannose phosphotransferase system component IIC is responsible for specific targeting by class IIa bacteriocins. *J Bacteriol* **192**, 5906-5913.

Kouidhi, B., Zmantar, T., Hentati, H. & Bakhrouf, A. (2010). Cell surface hydrophobicity, biofilm formation, adhesives properties and molecular detection of adhesins genes in *Staphylococcus aureus* associated to dental caries. *Microb Pathog* **49**, 14-22.

Kovács, M., Halfmann, A., Fedtke, I., Heintz, M., Peschel, A., Vollmer, W., Hakenbeck, R. &

- Brückner, R. (2006).** A functional dlt operon, encoding proteins required for incorporation of d-alanine in teichoic acids in gram-positive bacteria, confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **188**, 5797-5805.
- Kramer, N. E., Hasper, H. E., van den Bogaard, P. T. C., Morath, S., de Kruijff, B., Hartung, T., Smid, E. J., Breukink, E., Kok, J. & Kuipers, O. P. (2008).** Increased D-alanylation of lipoteichoic acid and a thickened septum are main determinants in the nisin resistance mechanism of *Lactococcus lactis*. *Microbiology (Reading, Engl)* **154**, 1755-1762.
- Kristiansen, P. E., Fimland, G., Mantzilas, D. & Nissen-Meyer, J. (2005).** Structure and mode of action of the membrane-permeabilizing antimicrobial peptide pheromone plantaricin A. *J Biol Chem* **280**, 22945-22950.
- Kristian, S. A., Datta, V., Weidenmaier, C., Kansal, R., Fedtke, I., Peschel, A., Gallo, R. L. & Nizet, V. (2005).** D-alanylation of teichoic acids promotes group A *streptococcus* antimicrobial peptide resistance, neutrophil survival, and epithelial cell invasion. *J Bacteriol* **187**, 6719-6725.
- Kuhry, J. G., Poindron, P. & Laustriat, G. (1983).** Evidence for early fluidity changes in the plasma membranes of interferon treated L cells, from fluorescence anisotropy data. *Biochem Biophys Res Commun* **110**, 88-95.
- Kuhry, J. G., Duportail, G., Bronner, C. & Laustriat, G. (1985).** Plasma membrane fluidity measurements on whole living cells by fluorescence anisotropy of trimethylammoniumdiphenylhexatriene. *Biochim Biophys Acta* **845**, 60-67.
- Lacroix, C. & Yildirim, S. (2007).** Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality. *Curr Opin Biotechnol* **18**, 176-183.
- Lai, S. & Manchester, L. N. (2000).** Numerical phenetic study of the genus *Carnobacterium*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **78**, 73-85.
- LePecq, J. B. & Paoletti, C. (1967).** A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids. Physical-chemical characterization. *J Mol Biol* **27**, 87-106.
- Leer, R. J., van der Vossen, J. M., van Giezen, M., van Noort, J. M. & Pouwels, P. H. (1995).** Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiology (Reading, Engl)* **141 (Pt 7)**, 1629-1635.
- Lee, D. K., Park, S. Y., Jang, S., Baek, E. H., Kim, M. J., Huh, S. M., Choi, K. S., Chung, M. J., Kim, J. E., & other authors. (2011a).** The combination of mixed lactic acid bacteria and dietary fiber lowers serum cholesterol levels and fecal harmful enzyme activities in rats. *Arch Pharm Res* **34**, 23-29.
- Lee, J., Kim, Y., Yun, H. S., Kim, J. G., Oh, S. & Kim, S. H. (2010).** Genetic and proteomic analysis of factors affecting serum cholesterol reduction by *Lactobacillus acidophilus* A4. *Appl Environ Microbiol* **76**, 4829-4835.
- Lee, J., Yun, H. S., Cho, K. W., Oh, S., Kim, S. H., Chun, T., Kim, B. & Whang, K. Y. (2011b).** Evaluation of probiotic characteristics of newly isolated *Lactobacillus* spp.: immune modulation and longevity. *Int J Food Microbiol* **148**, 80-86.
- Leisner, J. J., Laursen, B. G., Prévost, H., Drider, D. & Dalgaard, P. (2007).** *Carnobacterium*: positive and negative effects in the environment and in foods. *FEMS Microbiol Rev* **31**, 592-613.
- Leroi, F., Joffraud, J. J., Chevalier, F. & Cardinal, M. (1998).** Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8 degrees C. *Int J Food Microbiol* **39**, 111-121.
- Leroy, F. & de Vuyst, L. (1999).** Temperature and pH conditions that prevail during fermentation of

sausages are optimal for production of the antilisterial bacteriocin sakacin K. *Appl Environ Microbiol* **65**, 974-981.

Limonet, M., Revol-Junelles, A.-M. & Millière, J.-B. (2002). Variations in the Membrane Fatty Acid Composition of Resistant or Susceptible *Leuconostoc* or *Weissella* Strains in the Presence or Absence of Mesenterocin 52A and Mesenterocin 52B Produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52. *Appl Environ Microbiol* **68**, 2910-2916.

Lindgren, S. E. & Dobrogosz, W. J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol Rev* **7**, 149-163.

Liu, S. & Wang, Y. (2010). Application of AFM in microbiology: a review. *Scanning* **32**, 61-73.

Liu, S. & Wang, Y. (2011). A Review of the Application of Atomic Force Microscopy (AFM) in Food Science and Technology. *Adv Food Nutr Res* **62**, 201-240.

Lorite, G. S., Rodrigues, C. M., de Souza, A. A., Kranz, C., Mizaikoff, B. & Cotta, M. A. (2011). The role of conditioning film formation and surface chemical changes on *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm evolution. *Journal of Colloid and Interface Science* **359**, 289-295.

Louise Meyer, R., Zhou, X., Tang, L., Arpanaei, A., Kingshott, P. & Besenbacher, F. (2010). Immobilisation of living bacteria for AFM imaging under physiological conditions. *Ultramicroscopy* **110**, 1349-1357.

Lyklema, J. (2005). *Fundamentals of interface and colloid science*. Academic Press.

Maftah, A., Renault, D., Vignoles, C., Héchard, Y., Bressollier, P., Ratinaud, M. H., Cenatiempo, Y. & Julien, R. (1993). Membrane permeabilization of *Listeria monocytogenes* and mitochondria by the bacteriocin mesentericin Y105. *J Bacteriol* **175**, 3232-3235.

Marshall, K. C., Stout, R. & Mitchell, R. (1971). Selective sorption of bacteria from seawater. *Can J Microbiol* **17**, 1413-1416.

Marteau, P., Flourie, B., Pochart, P., Chastang, C., Desjeux, J. F. & Rambaud, J. C. (1990). Effect of the microbial lactase (EC 3.2.1.23) activity in yoghurt on the intestinal absorption of lactose: an in vivo study in lactase-deficient humans. *Br J Nutr* **64**, 71-79.

Marteau, P. R., de Vrese, M., Cellier, C. J. & Schrezenmeir, J. (2001). Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr* **73**, 430S-436S.

Martin-Visscher, L. A., van Belkum, M. J., Garneau-Tsodikova, S., Whittall, R. M., Zheng, J., McMullen, L. M. & Vederas, J. C. (2008). Isolation and Characterization of Carnocyclin A, a Novel Circular Bacteriocin Produced by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307. *Appl Environ Microbiol* **74**, 4756-4763.

Martin, Y., Williams, C. C. & Wickramasinghe, H. K. (1987). Atomic force microscope-force mapping and profiling on a sub 100-Å scale. *J Appl Phys* **61**, 4723.

Marugg, J. D., Gonzalez, C. F., Kunka, B. S., Ledebor, A. M., Pucci, M. J., Toonen, M. Y., Walker, S. A., Zoetmulder, L. C. & Vandenbergh, P. A. (1992). Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, and bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. *Appl Environ Microbiol* **58**, 2360-2367.

Mastronicolis, S. K., Berberi, A., Diakogiannis, I., Petrova, E., Kiaki, I., Baltzi, T. & Xenikakis, P. (2010). Alteration of the phospho- or neutral lipid content and fatty acid composition in *Listeria monocytogenes* due to acid adaptation mechanisms for hydrochloric, acetic and lactic acids at pH 5.5 or benzoic acid at neutral pH. *Antonie Van Leeuwenhoek* **98**, 307-316.

- Mañé, J., Pedrosa, E., Lorén, V., Gassull, M. A., Espadaler, J., Cuñé, J., Audivert, S., Bonachera, M. A. & Cabré, E. (2011).** A mixture of *Lactobacillus plantarum* CECT 7315 and CECT 7316 enhances systemic immunity in elderly subjects. A dose-response, double-blind, placebo-controlled, randomized pilot trial. *Nutr Hosp* **26**, 228-235.
- McBride, S. M. & Sonenshein, A. L. (2011).** The dlt operon confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Clostridium difficile*. *Microbiology (Reading, Engl)* **157**, 1457-1465.
- McCormick, J. K., Worobo, R. W. & Stiles, M. E. (1996).** Expression of the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 by a signal peptide-dependent general secretory pathway. *Appl Environ Microbiol* **62**, 4095-4099.
- van der Mei, H. C. & Busscher, H. J. (2001).** Electrophoretic mobility distributions of single-strain microbial populations. *Appl Environ Microbiol* **67**, 491-494.
- van der Mei, H. C., Léonard, A. J., Weerkamp, A. H., Rouxhet, P. G. & Busscher, H. J. (1988).** Surface properties of *Streptococcus salivarius* HB and nonfibrillar mutants: measurement of zeta potential and elemental composition with X-ray photoelectron spectroscopy. *J Bacteriol* **170**, 2462-2466.
- Mejlholm, O., Bøknaes, N. & Dalgaard, P. (2005).** Shelf life and safety aspects of chilled cooked and peeled shrimps (*Pandalus borealis*) in modified atmosphere packaging. *J Appl Microbiol* **99**, 66-76.
- Mejlholm, O., Kjeldgaard, J., Modberg, A., Vest, M. B., Bøknaes, N., Koort, J., Björkroth, J. & Dalgaard, P. (2008).** Microbial changes and growth of *Listeria monocytogenes* during chilled storage of brined shrimp (*Pandalus borealis*). *Int J Food Microbiol* **124**, 250-259.
- van Merode, A. E. J., van der Mei, H. C., Busscher, H. J., Waar, K. & Krom, B. P. (2006).** *Enterococcus faecalis* strains show culture heterogeneity in cell surface charge. *Microbiology* **152**, 807-814.
- Miller, A., Morgan, M. E. & Libbey, L. M. (1974).** *Lactobacillus maltaromicus*, a New Species Producing a Malty Aroma. *International Journal of Systematic Bacteriology* **24**, 346 -354.
- Miller, K. W., Schamber, R., Osmanagaoglu, O. & Ray, B. (1998a).** Isolation and characterization of pediocin ACh chimeric protein mutants with altered bactericidal activity. *Appl Environ Microbiol* **64**, 1997-2005.
- Miller, K. W., Schamber, R., Chen, Y. & Ray, B. (1998b).** Production of active chimeric pediocin ACh in *Escherichia coli* in the absence of processing and secretion genes from the *Pediococcus* pap operon. *Appl Environ Microbiol* **64**, 14-20.
- Miller, K. W., Ray, P., Steinmetz, T., Hanekamp, T. & Ray, B. (2005).** Gene organization and sequences of pediocin ACh/PA-1 production operons in *Pediococcus* and *Lactobacillus* plasmids. *Lett Appl Microbiol* **40**, 56-62.
- Miller, M. B. & Bassler, B. L. (2001).** Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **55**, 165-199.
- Ming Xintian & Daeschel, M. A. (1993).** Nisin resistance of foodborne bacteria and the specific resistance responses of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J Food Protect* **56**, 944-948.
- Ming, X. & Daeschel, M. A. (1995).** Correlation of cellular phospholipid content with nisin resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J Food Protect* **58**, 416-420.
- Molenaar, D., Abee, T. & Konings, W. N. (1991).** Continuous measurement of the cytoplasmic pH in *Lactococcus lactis* with a fluorescent pH indicator. *Biochim Biophys Acta* **1115**, 75-83.

- Moll, G. N., Konings, W. N. & Driessen, A. J. (1999).** Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**, 185-198.
- Mora, D., Scarpellini, M., Franzetti, L., Colombo, S. & Galli, A. (2003).** Reclassification of *Lactobacillus maltaromicus* (Miller et al. 1974) DSM 20342(T) and DSM 20344 and *Carnobacterium piscicola* (Collins et al. 1987) DSM 20730(T) and DSM 20722 as *Carnobacterium maltaromaticum* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 675-678.
- de Moreno de Leblanc, A. & Perdigón, G. (2010).** The application of probiotic fermented milks in cancer and intestinal inflammation. *Proc Nutr Soc* **69**, 421-428.
- Morisset, D., Berjeaud, J.-M., Marion, D., Lacombe, C. & Frère, J. (2004).** Mutational Analysis of Mesentericin Y105, an Anti-*Listeria* Bacteriocin, for Determination of Impact on Bactericidal Activity, In Vitro Secondary Structure, and Membrane Interaction. *Appl Environ Microbiol* **70**, 4672-4680.
- Motta, A. S., Flores, F. S., Souto, A. A. & Brandelli, A. (2008).** Antibacterial activity of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus* sp. P34 that targets the bacterial cell envelope. *Antonie Van Leeuwenhoek* **93**, 275-284.
- Muller, D. J., Helenius, J., Alsteens, D. & Dufrene, Y. F. (2009).** Force probing surfaces of living cells to molecular resolution. *Nat Chem Biol* **5**, 383-390.
- Méchin, L., Dubois-Brissonnet, F., Heyd, B. & Leveau, J. Y. (1999).** Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 to didecyldimethylammonium bromide induces changes in membrane fatty acid composition and in resistance of cells. *J Appl Microbiol* **86**, 859-866.
- Métivier, A., Pilet, M. F., Dousset, X., Sorokine, O., Anglade, P., Zagorec, M., Piard, J. C., Marion, D., Cenatiempo, Y. & Fremaux, C. (1998).** Divercin V41, a new bacteriocin with two disulphide bonds produced by *Carnobacterium divergens* V41: primary structure and genomic organization. *Microbiology (Reading, Engl)* **144** (Pt 10), 2837-2844.
- Métivier, A., Boyaval, P., Duffes, F., Dousset, X., Compoin, J. P. & Marion, D. (2000).** Triton X-114 phase partitioning for the isolation of a pediocin-like bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *Lett Appl Microbiol* **30**, 42-46.
- Müller, D. J., Krieg, M., Alsteens, D. & Dufrene, Y. F. (2009).** New frontiers in atomic force microscopy: analyzing interactions from single-molecules to cells. *Curr Opin Biotechnol* **20**, 4-13.
- Naghmouchi, K., Drider, D., Kheadr, E., Lacroix, C., Prévost, H. & Fliss, I. (2006).** Multiple characterizations of *Listeria monocytogenes* sensitive and insensitive variants to divergicin M35, a new pediocin-like bacteriocin. *J Appl Microbiol* **100**, 29-39.
- Naghmouchi, K., Drider, D. & Fliss, I. (2007).** Action of divergicin M35, a class IIa bacteriocin, on liposomes and *Listeria*. *J Appl Microbiol* **102**, 1508-1517.
- Nakano, K., Nomura, R., Matsumoto, M. & Ooshima, T. (2010).** Roles of oral bacteria in cardiovascular diseases--from molecular mechanisms to clinical cases: Cell-surface structures of novel serotype k *Streptococcus mutans* strains and their correlation to virulence. *J Pharmacol Sci* **113**, 120-125.
- Natale, P., Brüser, T. & Driessen, A. J. M. (2008).** Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane--Distinct translocases and mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1778**, 1735-1756.
- Nes, I. F. & Eijsink, V. G. (1999).** Regulation of group II peptide bacteriocin synthesis by quorum-sensing mechanisms. In *Cell-cell signalling in bacteria*, American Society for Microbiology., pp. 175-192. Washington, D.C.

- Nes, I. F., Diep, D. B., Håvarstein, L. S., Brurberg, M. B., Eijsink, V. & Holo, H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **70**, 113-128.
- Nguyen, V. T., Turner, M. S. & Dykes, G. A. (2011). Influence of cell surface hydrophobicity on attachment of *Campylobacter* to abiotic surfaces. *Food Microbiology* **28**, 942-950.
- Nichols, A. W. (2007). Probiotics and athletic performance: a systematic review. *Curr Sports Med Rep* **6**, 269-273.
- Nilsson, L., Gram, L. & Huss, H. H. (1999). Growth control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora. *J Food Prot* **62**, 336-342.
- Nilsson, L., Hansen, T. B., Garrido, P., Buchrieser, C., Glaser, P., Knøchel, S., Gram, L. & Gravesen, A. (2005). Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by a nonbacteriocinogenic *Carnobacterium piscicola*. *J Appl Microbiol* **98**, 172-183.
- Nilsson, L., Nielsen, M. K., Ng, Y. & Gram, L. (2002). Role of acetate in production of an autoinducible class IIa bacteriocin in *Carnobacterium piscicola* A9b. *Appl Environ Microbiol* **68**, 2251-2260.
- Nissen-Meyer, J., Rogne, P., Oppegård, C., Haugen, H. S. & Kristiansen, P. E. (2009). Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Curr Pharm Biotechnol* **10**, 19-37.
- Noy. (2006). Chemical force microscopy of chemical and biological interactions. *Surface And Interface Analysis* **38**, 1429-1441.
- Nyarko, E., Hara, T., Grab, D. J., Habib, A., Kim, Y., Nikolskaia, O., Fukuma, T. & Tabata, M. (2004). In vitro toxicity of palladium(II) and gold(III) porphyrins and their aqueous metal ion counterparts on *Trypanosoma brucei brucei* growth. *Chemico-Biological Interactions* **148**, 19-25.
- Ohshima. (2000). On the General Expression for the Electrophoretic Mobility of a Soft Particle. *J Colloid Interface Sci* **228**, 190-193.
- Ohshima, H. & Kondo, T. (1993). Electrophoretic mobility of a “soft particle” with a nonuniformly charged surface layer as a model for cells. *Biophys Chem* **46**, 145-152.
- Ohshima, H. (2010a). Limiting electrophoretic mobility of a highly charged soft particle in an electrolyte solution: solidification effect. *J Colloid Interface Sci* **349**, 641-644.
- Ohshima, H. (2010b). *Biophysical Chemistry of Biointerfaces*. Wiley-Interscience.
- Opsata, M., Nes, I. F. & Holo, H. (2010). Class IIa bacteriocin resistance in *Enterococcus faecalis* V583: the mannose PTS operon mediates global transcriptional responses. *BMC Microbiol* **10**, 224.
- Oss, C. J. V. (1975). *Phagocytic engulfment and cell adhesiveness as cellular surface phenomena*. M. Dekker.
- Oss, C. J. V. (2006). *Interfacial forces in aqueous media*. Taylor & Francis.
- Oss, C. J. van. (1994). *Interfacial Forces in Aqueous Media*, 1st edn. CRC Press.
- Ouhara, K., Komatsuzawa, H., Yamada, S., Shiba, H., Fujiwara, T., Ohara, M., Sayama, K., Hashimoto, K., Kurihara, H. & Sugai, M. (2005). Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides, {beta}-defensins and LL37, produced by human epithelial cells. *J Antimicrob Chemother* **55**, 888-896.
- Palmer, J. S., Flint, S. H., Schmid, J. & Brooks, J. D. (2010). The role of surface charge and hydrophobicity in the attachment of *Anoxybacillus flavithermus* isolated from milk powder. *J Ind*

Microbiol Biotechnol **37**, 1111-1119.

Pan, D. D., Zeng, X. Q. & Yan, Y. T. (2011). Characterisation of *Lactobacillus fermentum* SM-7 isolated from koumiss, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *J Sci Food Agric* **91**, 512-518.

Park, B.-J. & Abu-Lail, N. I. (2010). Variations in the Nanomechanical Properties of Virulent and Avirulent *Listeria monocytogenes*. *Soft Matter* **6**, 3898-3909.

Pearson, R. D., Steigbigel, R. T., Davis, H. T. & Chapman, S. W. (1980). Method of reliable determination of minimal lethal antibiotic concentrations. *Antimicrob Agents Chemother* **18**, 699-708.

du Plessis, D. J. F., Nouwen, N. & Driessen, A. J. M. (2011). The Sec translocase. *Biochim Biophys Acta* **1808**, 851-865.

Postma, P. W., Lengeler, J. W. & Jacobson, G. R. (1993). Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev* **57**, 543-594.

Potter, R., Truelstrup Hansen, L. & Gill, T. A. (2005). Inhibition of foodborne bacteria by native and modified protamine: importance of electrostatic interactions. *Int J Food Microbiol* **103**, 23-34.

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

Quadri, L. E., Sailer, M., Terebiznik, M. R., Roy, K. L., Vederas, J. C. & Stiles, M. E. (1995). Characterization of the protein conferring immunity to the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 and expression of carnobacteriocins B2 and BM1. *J Bacteriol* **177**, 1144-1151.

Quadri, L. E., Kleerebezem, M., Kuipers, O. P., de Vos, W. M., Roy, K. L., Vederas, J. C. & Stiles, M. E. (1997). Characterization of a locus from *Carnobacterium piscicola* LV17B involved in bacteriocin production and immunity: evidence for global inducer-mediated transcriptional regulation. *J Bacteriol* **179**, 6163-6171.

Quadri, L. E. N. (2003). Regulation of Class II Bacteriocin Production by Cell-Cell Signaling. *Society* **41**, 175-182.

Rajalakshmi, R. & Vanaja, K. (1967). Chemical and biological evaluation of the effects of fermentation on the nutritive value of foods prepared from rice and grams. *Br J Nutr* **21**, 467-473.

Ramnath, M., Arous, S., Gravesen, A., Hastings, J. W. & Héchard, Y. (2004). Expression of mptC of *Listeria monocytogenes* induces sensitivity to class IIa bacteriocins in *Lactococcus lactis*. *Microbiology (Reading, Engl)* **150**, 2663-2668.

Rasić, J. L. & Kurmann, J. A. (1983). Bifidobacteria and their role. Microbiological, nutritional-physiological, medical and technological aspects and bibliography. *Experientia Suppl* **39**, 1-295.

Rawlinson, L.-A. B., O’Gara, J., Jones, D. S. & Brayden, D. J. (2011). Resistance of *Staphylococcus aureus* to the cationic antimicrobial agent pDMAEMA is influenced by cell surface charge and hydrophobicity. *J Med Microbiol*.

Richard, C., Cañon, R., Naghmouchi, K., Bertrand, D., Prévost, H. & Drider, D. (2006). Evidence on correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class IIa bacteriocins. *Food Microbiol* **23**, 175-183.

Rihakova, J., Petit, V. W., Demnerova, K., Prévost, H., Rebuffat, S. & Drider, D. (2009). Insights into structure-activity relationships in the C-terminal region of divercin V41, a class IIa bacteriocin with high-level antilisterial activity. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 1811-1819.

- van de Rijn, I. & Kessler, R. E. (1979).** Chemical analysis of changes in membrane composition during growth of *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* **26**, 883-891.
- Rodríguez, V. V., Busscher, H. J., Norde, W. & van der Mei, H. C. (2002).** Softness of the bacterial cell wall of *Streptococcus mitis* as probed by microelectrophoresis. *Electrophoresis* **23**, 2007-2011.
- Rohde, B. H. & Quadri, L. E. N. (2006).** Functional characterization of a three-component regulatory system involved in quorum sensing-based regulation of peptide antibiotic production in *Carnobacterium maltaromaticum*. *BMC Microbiol* **6**, 93.
- Rouse, S. & van Sinderen, D. (2008).** Bioprotective potential of lactic acid bacteria in malting and brewing. *J Food Prot* **71**, 1724-1733.
- Roy, D. (2005).** Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products. *Le Lait* **85**, 18.
- Russell, J. & Cook, G. (1995).** Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions. *Microbiol Rev* **59**, 48-62.
- Salle, A. J. & Jann, G. J. (1946).** Effect of subtilin on the course of experimental anthrax infections in guinea pigs. *Proc Soc Exp Biol Med* **63**, 41.
- Sader, J. E., Larson, I., Mulvaney, P. & White, L. R. (1995).** Method for the calibration of atomic force microscope cantilevers. *Review of Scientific Instruments* **66**, 3789-3798.
- Sakamoto, K. & Konings, W. N. (2003).** Beer spoilage bacteria and hop resistance. *Int J Food Microbiol* **89**, 105-124.
- Sakayori, Y., Muramatsu, M., Hanada, S., Kamagata, Y., Kawamoto, S. & Shima, J. (2003).** Characterization of *Enterococcus faecium* mutants resistant to mundticin KS, a class IIa bacteriocin. *Microbiology (Reading, Engl)* **149**, 2901-2908.
- Samot, J., Lebreton, J. & Badet, C. (2011).** Adherence capacities of oral *lactobacilli* for potential probiotic purposes. *Anaerobe*.
- Sanders, M. E., Walker, D. C., Walker, K. M., Aoyama, K. & Klaenhammer, T. R. (1996).** Performance of commercial cultures in fluid milk applications. *J Dairy Sci* **79**, 943-955.
- Schirmer, B. C., Heir, E. & Langsrud, S. (2009).** Characterization of the bacterial spoilage flora in marinated pork products. *J Appl Microbiol* **106**, 2106-2116.
- Schäffer, E. & Thiele, U. (2004).** Dynamic domain formation in membranes: thickness-modulation-induced phase separation. *Eur Phys J E Soft Matter* **14**, 169-175.
- Schär-Zammaretti, P. & Ubbink, J. (2003).** The Cell Wall of Lactic Acid Bacteria: Surface Constituents and Macromolecular Conformations. *Biophys J* **85**, 4076-4092.
- Schöbitz, R. P., Bórquez, P. A., Costa, M. E., Ciampi, L. R. & Brito, C. S. (2006).** Bacteriocin like substance production by *Carnobacterium piscicola* in a continuous system with three culture broths. Study of antagonism against *Listeria monocytogenes* on vacuum packaged salmon. *Braz J Microbiol* **37**, 52-57.
- Shai, Y. (1999).** Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by [alpha]-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta* **1462**, 55-70.
- Sheu, C. W., Konings, W. N. & Freese, E. (1972).** Effects of acetate and other short-chain fatty acids

on sugar and amino acid uptake of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **111**, 525-530.

Simon, L., Fremaux, C., Cenatiempo, Y. & Berjeaud, J. M. (2002). Sakacin g, a new type of antilisterial bacteriocin. *Appl Environ Microbiol* **68**, 6416-6420.

Smit, G., Smit, B. A. & Engels, W. J. M. (2005a). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 591-610.

Smit, G., Smit, B. A. & Engels, W. J. M. (2005b). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 591-610.

Sodini, I., Remeuf, F., Haddad, S. & Corrieu, G. (2004). The relative effect of milk base, starter, and process on yogurt texture: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **44**, 113-137.

Sprules, T., Kawulka, K. E., Gibbs, A. C., Wishart, D. S. & Vederas, J. C. (2004). NMR solution structure of the precursor for carnobacteriocin B2, an antimicrobial peptide from *Carnobacterium piscicola*. Implications of the alpha-helical leader section for export and inhibition of type IIa bacteriocin activity. *Eur J Biochem* **271**, 1748-1756.

Steinkraus, K. H. (1996). *Handbook of indigenous fermented foods*. Marcel Dekker.

Stoddard, G. W., Petzel, J. P., van Belkum, M. J., Kok, J. & McKay, L. L. (1992). Molecular analyses of the lactococcin A gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* WM4. *Appl Environ Microbiol* **58**, 1952-1961.

Stoffels, G., Nes, I. F. & Guthmundsdóttir, A. (1992a). Isolation and properties of a bacteriocin-producing *Carnobacterium piscicola* isolated from fish. *J Appl Bacteriol* **73**, 309-316.

Stoffels, G., Nissen-Meyer, J., Gudmundsdottir, A., Sletten, K., Holo, H. & Nes, I. F. (1992b). Purification and characterization of a new bacteriocin isolated from a *Carnobacterium* sp. *Appl Environ Microbiol* **58**, 1417-1422.

La Storia, A., Ercolini, D., Marinello, F., Di Pasqua, R., Villani, F. & Mauriello, G. (2011). Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol-treated bacterial cells. *Res Microbiol* **162**, 164-172.

Strahl, H. & Hamoen, L. W. (2010). Membrane potential is important for bacterial cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 12281-12286.

Stöber, H., Maier, E. & Schmidt, H. (2010). Protective effects of *Lactobacilli*, *Bifidobacteria* and *Staphylococci* on the infection of cultured HT29 cells with different enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes are strain-specific. *Int J Food Microbiol* **144**, 133-140.

Suzuki, M., Yamamoto, T., Kawai, Y., Inoue, N. & Yamazaki, K. (2005). Mode of action of piscicocin CS526 produced by *Carnobacterium piscicola* CS526. *J Appl Microbiol* **98**, 1146-1151.

Svanberg, U., Sjögren, E., Lorri, W., Svennerholm, A.-M. & Kaijser, B. (1992). Inhibited growth of common enteropathogenic bacteria in lactic-fermented cereal gruels. *World J Microbiol Biotechnol* **8**, 601-606.

Swarts, A. J., Hastings, J. W., Roberts, R. F. & von Holy, A. (1998). Flow cytometry demonstrates bacteriocin-induced injury to *Listeria monocytogenes*. *Curr Microbiol* **36**, 266-270.

Takahashi, H., Suda, T., Tanaka, Y. & Kimura, B. (2010). Cellular hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* involves initial attachment and biofilm formation on the surface of polyvinyl chloride. *Lett Appl Microbiol* **50**, 618-625.

Takano, H., Kenseth, J. R., Wong, S. S., O'Brien, J. C. & Porter, M. D. (1999). Chemical and

biochemical analysis using scanning force microscopy. *Chem Rev* **99**, 2845-2890.

Tamime, A. Y. (2002). Fermented milks: a historical food with modern applications—a review. *Eur J Clin Nutr* **56**, S2-S15.

Tamime, A. Y., Tamime, A. Y., Robinson, R. K. & Robinson, R. K. (1999). *Yoghurt: Science and Technology, Second Edition*, 2nd edn. CRC Press.

Tessema, G. T., Møretrø, T., Kohler, A., Axelsson, L. & Naterstad, K. (2009). Complex phenotypic and genotypic responses of *Listeria monocytogenes* strains exposed to the class IIa bacteriocin sakacin P. *Appl Environ Microbiol* **75**, 6973-6980.

Tominaga, T. & Hatakeyama, Y. (2006). Determination of essential and variable residues in pediocin PA-1 by NNK scanning. *Appl Environ Microbiol* **72**, 1141-1147.

Tomita, H., Fujimoto, S., Tanimoto, K. & Ike, Y. (1996). Cloning and genetic organization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pYI17. *J Bacteriol* **178**, 3585-3593.

Uteng, M., Hauge, H. H., Markwick, P. R. L., Fimland, G., Mantzilas, D., Nissen-Meyer, J. & Muhle-Goll, C. (2003). Three-dimensional structure in lipid micelles of the pediocin-like antimicrobial peptide sakacin P and a sakacin P variant that is structurally stabilized by an inserted C-terminal disulfide bridge. *Biochemistry* **42**, 11417-11426.

Vadyvaloo, V., Hastings, J. W., van der Merwe, M. J. & Rautenbach, M. (2002). Membranes of Class IIa Bacteriocin-Resistant *Listeria monocytogenes* Cells Contain Increased Levels of Desaturated and Short-Acyl-Chain Phosphatidylglycerols. *Appl Environ Microbiol* **68**, 5223-5230.

Vadyvaloo, V., Arous, S., Gravesen, A., Héchard, Y., Chauhan-Haubrock, R., Hastings, J. W. & Rautenbach, M. (2004). Cell-surface alterations in class IIa bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* strains. *Microbiology* **150**, 3025-3033.

Venema, K., Kok, J., Marugg, J. D., Toonen, M. Y., Ledeboer, A. M., Venema, G. & Chikindas, M. L. (1995). Functional analysis of the pediocin operon of *Pediococcus acidilactici* PAC1.0: PedB is the immunity protein and PedD is the precursor processing enzyme. *Mol Microbiol* **17**, 515-522.

Verdon, J., Labanowski, J., Sahr, T., Ferreira, T., Lacombe, C., Buchrieser, C., Berjeaud, J.-M. & Héchard, Y. (2010). Fatty acid composition modulates sensitivity of *Legionella pneumophila* to warnericin RK, an antimicrobial peptide. *Biochim Biophys Acta*.

Vignolo, G., Fadda, S., de Kairuz, M. N., de Ruiz Holgado, A. A. & Oliver, G. (1996). Control of *Listeria monocytogenes* in ground beef by “Lactocin 705”, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705). *Int J Food Microbiol* **29**, 397-402.

Vihavainen, E., Lundström, H.-S., Susiluoto, T., Koort, J., Paulin, L., Auvinen, P. & Björkroth, K. J. (2007). Role of broiler carcasses and processing plant air in contamination of modified-atmosphere-packaged broiler products with psychrotrophic lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* **73**, 1136-1145.

Vu-Khac, H. & Miller, K. W. (2009). Regulation of mannose phosphotransferase system permease and virulence gene expression in *Listeria monocytogenes* by the EII(t)Man transporter. *Appl Environ Microbiol* **75**, 6671-6678.

de Vuyst, L. & Vandamme, E.J. (1994). Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In *Bacteriocins of lactic acid bacteria*, Blackie Academic and Professional., pp. 91-149. London.

Wallbanks, S., Martinez-Murcia, A. J., Fryer, J. L., Phillips, B. A. & Collins, M. D. (1990). 16S rRNA sequence determination for members of the genus *Carnobacterium* and related lactic acid

bacteria and description of *Vagococcus salmoninarum* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **40**, 224-230.

Wang, Y., Henz, M. E., Gallagher, N. L., Chai, S., Gibbs, A. C., Yan, L. Z., Stiles, M. E., Wishart, D. S. & Vederas, J. C. (1999). Solution structure of carnobacteriocin B2 and implications for structure-activity relationships among type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biochemistry* **38**, 15438-15447.

Wan, J., Harmark, K., Davidson, B. E., Hillier, A. J., Gordon, J. B., Wilcock, A., Hickey, M. W. & Coventry, M. J. (1997). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by piscicolin 126 in milk and Camembert cheese manufactured with a thermophilic starter. *J Appl Microbiol* **82**, 273-280.

Watson, R. M., Woody, R. W., Lewis, R. V., Bohle, D. S., Andreotti, A. H., Ray, B. & Miller, K. W. (2001). Conformational changes in pediocin AcH upon vesicle binding and approximation of the membrane-bound structure in detergent micelles. *Biochemistry* **40**, 14037-14046.

Weisenhorn, A. L., Hansma, P. K., Albrecht, T. R. & Quate, C. F. (1989). Forces in atomic force microscopy in air and water. *Applied Physics Letters* **54**, 2651-2653.

Worobo, R. W., Henkel, T., Sailer, M., Roy, K. L., Vederas, J. C. & Stiles, M. E. (1994). Characteristics and genetic determinant of a hydrophobic peptide bacteriocin, carnobacteriocin A, produced by *Carnobacterium piscicola* LV17A. *Microbiology (Reading, Engl)* **140 (Pt 3)**, 517-526.

Worobo, R. W., Van Belkum, M. J., Sailer, M., Roy, K. L., Vederas, J. C. & Stiles, M. E. (1995). A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *J Bacteriol* **177**, 3143-3149.

Xue, J., Hunter, I., Steinmetz, T., Peters, A., Ray, B. & Miller, K. W. (2005). Novel Activator of Mannose-Specific Phosphotransferase System Permease Expression in *Listeria innocua*, Identified by Screening for Pediocin AcH Resistance. *Appl Environ Microbiol* **71**, 1283-1290.

Yamazaki, K., Suzuki, M., Kawai, Y., Inoue, N. & Montville, T. J. (2005). Purification and characterization of a novel class IIa bacteriocin, piscicocin CS526, from surimi-associated *Carnobacterium piscicola* CS526. *Appl Environ Microbiol* **71**, 554-557.

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

Yokota, H., Nickerson, D. A., Trask, B. J., van den Engh, G., Hirst, M., Sadowski, I. & Aebersold, R. (1998). Mapping a protein-binding site on straightened DNA by atomic force microscopy. *Anal Biochem* **264**, 158-164.

Yoo, K.-S., Kim, J. E., Seo, E.-Y., Kim, Y. J., Choi, H. Y., Yoon, H.-S., Kim, M.-D. & Han, N. S. (2010). Improvement in sensory characteristics of Campbell Early wine by adding dual starters of *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni*. *J Microbiol Biotechnol* **20**, 1121-1127.

Zeraik, A. E. & Nitschke, M. (2010). Biosurfactants as Agents to Reduce Adhesion of Pathogenic Bacteria to Polystyrene Surfaces: Effect of Temperature and Hydrophobicity. *Curr Microbiol* **61**, 554-559.

Zhao, H., Sood, R., Jutila, A., Bose, S., Fimland, G., Nissen-Meyer, J. & Kinnunen, P. K. J. (2006a). Interaction of the antimicrobial peptide pheromone Plantaricin A with model membranes: Implications for a novel mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* **1758**, 1461-1474.

Zhao, H., Sood, R., Jutila, A., Bose, S., Fimland, G., Nissen-Meyer, J. & Kinnunen, P. K. J. (2006b). Interaction of the antimicrobial peptide pheromone Plantaricin A with model membranes: Implications for a novel mechanism of action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1758**, 1461-1474.

Zhong, Q., Inniss, D., Kjoller, K. & Elings, V. (1993). Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy. *Surface Science* **290**, L688-L692.

Zilber, I. K., Rosenberg, E. & Gutnick, D. (1980). Incorporation of P and Growth of Pseudomonad UP-2 on n-Tetracosane. *Appl Environ Microbiol* **40**, 1086-1093.

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur Alain DUFOUR, Professeur, Université de Bretagne Sud, Lorient

Monsieur Xavier DOUSSET, Professeur, ONIRIS, Nantes

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur JACQUET Thibaut Gregory

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Interactions peptides antibactériens - surfaces bactériennes. Etude de la
carnobactériocine Cbn BM1, une bactériocine de classe IIa. "**

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Intitulé du doctorat : « **Procédés Biotechnologiques et Alimentaires** »

Fait à Vandoeuvre, le 18 novembre 2011

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT



Interactions peptides antibactériens - surfaces bactériennes

Etude de la carnobactériocine Cbn BM1, une bactériocine de classe IIa

Résumé :

Les bactériocines de classe IIa présentent une activité antimicrobienne résultant d'un mécanisme d'action ciblant les membranes des bactéries à Gram positif. Cette activité est notamment modulée par différentes caractéristiques des surfaces bactériennes. Les propriétés physico-chimiques de surface de dix-huit souches bactériennes, sensibles ou résistantes à la carnobactériocine Cbn BM1, ont été déterminées afin d'étudier le lien entre ces propriétés et les phénotypes de résistance/sensibilité à Cbn BM1. Pour ce faire, des approches d'adhésion aux solvants et de mesures de mobilité électrophorétique ont été réalisées. Les résultats obtenus indiquent une grande diversité des propriétés physico-chimiques des surfaces analysées, sans cependant permettre d'établir un lien entre celles-ci et le phénotype de sensibilité/résistance à CbnBM1. Les mécanismes d'action de Cbn BM1 ont ensuite été étudiés sur *Carnobacterium maltaromaticum* DSM20730 et *Listeria monocytogenes* EGDe. L'atteinte de l'intégrité physique des membranes plasmiques par l'action de Cbn BM1 a été mise en évidence à l'aide de sondes fluorescentes spécifiques, le Syto9[®] et l'iodure de propidium, montrant une hétérogénéité de réponse des populations bactériennes traitées. Ce résultat a été confirmé par des mesures topologiques par microscopie de force atomique, qui ont permis de visualiser *in vivo* à haute résolution les dommages morphologiques dus à un traitement par Cbn BM1. L'interaction de Cbn BM1 avec les membranes a été mise en évidence par mesure de l'anisotropie de fluorescence de deux sondes, le TMA-DPH et le DPH, respectivement localisées à la surface et au cœur de la bicouche lipidique. Cette approche a révélé que Cbn BM1 présente des degrés de pénétration différents dans la membrane de *C. maltaromaticum* DSM20730 par rapport à *L. monocytogenes* EGDe. L'action de Cbn BM1 conduit cependant, pour les deux souches, à la modification de la force protomotrice membranaire en perturbant le potentiel $\Delta\psi$. Ces différentes approches retenues pour l'étude des mécanismes d'action ont révélé que *C. maltaromaticum* DSM20730 et *L. monocytogenes* EGDe présentent une sensibilité à Cbn BM1 uniquement lorsque les cellules sont en phase exponentielle de croissance. Les modifications des propriétés nano-mécaniques de *C. maltaromaticum* DSM20730 dues à l'action de Cbn BM1 ont également été étudiées à l'aide d'une approche de microscopie de force atomique.

Mots clés : carnobactériocine Cbn BM1, *Listeria*, *Carnobacterium*, mécanisme d'action, anisotropie de fluorescence, microscopie de force atomique, mobilité électrophorétique, adhésion aux solvants, force proto-motrice

Abstract :

The antimicrobial activity of class IIa bacteriocins toward Gram positive bacteria relies on their membrane targeting mechanisms of action. These mechanisms are modulated by the bacterial surface properties. The physico-chemical surface properties of eighteen bacterial strains were determined to link these properties to the resistance/sensitivity to Cbn BM1 of the bacterial strains. In this way, two approaches were undertaken : the microbial adhesion to solvents and electrophoretic mobility measurements. The results show a large diversity of the determined properties among the strains but without establishing a direct link between the surface properties and the resistance/sensitivity phenotypes. Mechanisms of action of the bacteriocin Cbn BM1 on *Carnobacterium maltaromaticum* DSM20730 and *Listeria monocytogenes* EGDe were determined. Syto9[®] and propidium iodide allowed to show the heterogeneity of the bacterial populations toward the alteration of the membrane integrity. The interaction of Cbn BM1 with the bacterial membrane was studied by monitoring the fluorescence anisotropy of DPH and TMA-DPH. The results highlight a difference between the mechanism of action of Cbn BM1 on *C. maltaromaticum* DSM20730 and on *L. monocytogenes* EGDe. However, a treatment by Cbn BM1 leads to a perturbation of the component of the proton-motive force of the membrane for both strains. These approaches revealed that these bacterial strains exhibit a sensitivity to Cbn BM1 only when treated in log growth phase. Modification of nano-mechanical properties of *C. maltaromaticum* DSM20730 after a treatment by Cbn BM1 were assessed by an atomic force microscopy approach.

Keywords : carnobacteriocin Cbn BM1, *Listeria*, *Carnobacterium*, mechanism of action, fluorescence anisotropy, atomic force microscopy, electrophoretic mobility, adhesion to solvents, proton-motive force.