



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>

Amélioration de la production hétérologue de
la bactériocine pédiocine chez
Lactococcus lactis

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 16 décembre 2014

pour l'obtention du

Doctorat de l'Université de Lorraine

(mention Procédés Biotechnologiques et Alimentaires)

par

Alexandre Back

Composition du jury

<i>Rapporteurs :</i>	Alain Dufour	Professeur, LBCM, UBS, Lorient
	Djamel Drider	Professeur, ProBioGEM, Polytech'Lille, Villeneuve d'Ascq
<i>Examineurs :</i>	Catherine Cailliez-Grimal	Maître de conférence HDR, LIBio, UL, Nancy
	Frédéric Borges	Maître de conférence, LIBio, UL, Nancy
<i>Invités :</i>	Cécile Mangavel	Ingénieur de recherche, LIBio, UL, Nancy
	Stéphane Delaunay	Professeur, LRGP, UL, Nancy

Remerciements

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

J'exprime toute ma reconnaissance à Madame Catherine Cailliez-Grimal, Maître de conférences HDR à l'Université de Lorraine (IUT Nancy-Brabois), et à Monsieur Frédéric Borges, Maître de conférences à l'Université de Lorraine (ENSAIA) pour avoir accepté de diriger ce travail. Je leur exprime toute ma gratitude, pour leur patience, leur encadrement, leurs conseils ainsi que pour avoir patiemment corrigé ce document.

Je remercie Madame Anne-Marie Revol-Junelles, Professeur à l'Université de Lorraine (ENSAIA) et co-directrice du Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules pour ses conseils et pour avoir corrigé ce document.

J'adresse mes remerciements à Messieurs Alain Dufour, Professeur au LBCM de l'Université de Bretagne Sud, et Djamel Drider, Professeur au laboratoire ProBioGEM de l'Université de Lille 1-Polytech'Lille, qui ont accepté de juger ce travail en qualité de rapporteurs.

Je remercie particulièrement Cécile Mangavel, Ingénieur de recherche de l'Université de Lorraine (ENSAIA) pour m'avoir aidé durant ces trois années, pour avoir corrigé ce document et qui a accepté de faire partie de ce jury comme invitée.

Je remercie également Stéphane Delaunay, Professeur au LRGP de l'Université de Lorraine (ENSAIA) pour tous les conseils qu'il m'a donné durant ces trois années et pour avoir accepté de faire partie de ce jury en tant qu'invité.

Je voudrai également remercier Florentin Michaux et Jordane Jasniewski pour le surnom qu'ils m'ont donné.

Je remercie Mme Christine Fivet pour avoir patiemment répondu à mes questions durant ces trois années.

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel technique du laboratoire qui m'a aidé durant ces trois ans. Tout particulièrement Arnaud Khemisti pour son aide, sa disponibilité, et son amitié ainsi que Frédéric Maujean et Cédric Paris, pour le temps qu'il a passé à m'aider.

Mes compagnons de thèse présent et passé : Charlotte, Jennifer, Abdour, Magda, Christelle, Mounia, Smail, Yoana, Mariam ma collègue des week-ends et jours fériés, Adrien, Ghazi et mes compagnons de microbiologie Sarah et Christelle.

Je remercie les doctorants de BioProMo sans qui cette thèse n'aurait pas été la même : Pierrick, sa binomo Nadia, ainsi que Alice, Julien et Léna. Enfin je ne remercie pas M. Karim pour son aide, car il n'aime pas cela.

Je remercie également les autres membres de l'équipe BioProMo qui m'ont aidé : Emmanuel Rondags, Eric Olmos, Marie-Laure Collignon, Romain Kapel et Fabrice Blanchard pour la nourriture italienne. Je remercie tout particulièrement Arnaud Aymes pour le temps qu'il a passé à me montrer le fonctionnement l'AKTA et sans qui cette thèse n'aurait pas été la même.

Je tiens à remercier Laureen Hallez et Alexis Boutilliat pour l'aide qu'ils m'ont apporté durant leur stage et leur souhaite le meilleur pour l'avenir.

Je remercie ma famille qui m'a aidé durant ces 3 difficiles années. Et Céline pour beaucoup de choses.

The only limit to our realization of tomorrow will be our doubts of today.
FDR

Sommaire

Avant-Propos	xi
Table des figures	xv
Liste des tableaux	xvii
Liste des Abréviations	xix

Chapitre I

Synthèse Bibliographique

1

I.1	Les Bactériocines	1
I.1.1	Définition	2
I.1.2	Classification des bactériocines produites par les bactéries gram-positives	2
a)	Classe I	4
b)	Classe II	5
c)	Classe III	8
d)	Classe IV	8
I.1.3	Applications des bactériocines	8
a)	Application en agroalimentaire	8
b)	Applications médicales	9
I.2	Bactériocines de la sous-classe IIa	10
I.2.1	Génétique des bactériocines de la sous-classe IIa	10
I.2.2	Biosynthèse des bactériocines de la sous-classe IIa	12
I.2.3	Régulation de la biosynthèse des bactériocines de la sous-classe IIa .	14
I.2.4	Rôle des différentes structures et régions des bactériocines de la sous-classe IIa	15

a)	La région N-terminale	18
b)	La région C-terminale	19
c)	Les ponts disulfures	21
I.2.5	Mécanisme d'action des bactériocines de la sous-classe IIa	23
a)	Adsorption <i>via</i> un récepteur membranaire	23
b)	Modèles de mécanismes d'action membranaire	24
c)	Actions des bactériocines sur la physiologie de la bactérie cible	24
I.2.6	Protéines d'immunité des bactériocines de la sous-classe IIa	26
I.3	Expression hétérologue de bactériocines recombinantes de la sous-classe IIa	26
I.3.1	Expression hétérologue	27
I.3.2	Expression hétérologue de bactériocines recombinantes de la sous- classe IIa chez <i>Escherichia coli</i>	28
a)	Stratégie générale de production de protéines recombi- nantes chez <i>E. coli</i>	28
b)	Production de bactériocines recombinantes chez <i>E. coli</i> . .	28
I.3.3	Expression hétérologue de bactériocines recombinantes de la sous- classe IIa chez les levures	32
a)	Intérêts technologiques des levures	32
b)	Production hétérologue de bactériocines <i>via</i> des levures . .	32
I.3.4	Expression hétérologue de bactériocines recombinantes de la sous- classe IIa chez <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> et <i>cremoris</i>	35
a)	Intérêts technologiques de la bactérie <i>L. lactis</i>	35
b)	Stratégie de production hétérologue chez <i>L. lactis</i>	35
c)	Production hétérologue de bactériocines de la sous-classe IIa par <i>L. lactis</i>	39
I.3.5	Expression hétérologue de bactériocines recombinantes de la sous- classe IIa chez d'autres hôtes bactériens	43
I.4	Stratégies de purification de bactériocines la sous-classe IIa	44
I.4.1	Stratégie pour la purification de bactériocines recombinantes sans étiquette d'affinité	45
I.4.2	Purification de bactériocines recombinantes par chromatographie d'affinité <i>via</i> l'utilisation d'une étiquette	48
I.5	Formation des ponts disulfures chez les bactéries	52

I.5.1	Les thiol-disulfides oxydoréductases de la bactérie <i>E. coli</i>	52
I.5.2	Les thiol-disulfides oxydoréductases de la bactérie <i>B. subtilis</i>	55
I.5.3	Les thiol-disulfides oxydoréductases chez les autres bactéries gram-positives	56
I.5.4	Les thiol-disulfides oxydoréductases et les bactériocines de la sous-classe IIa	56

Objectifs de la thèse	59
------------------------------	-----------

Chapitre II	
Matériel & Méthodes	61

II.1	Microbiologie	61
II.1.1	Souches et conditions de culture	61
a)	<i>Lactococcus lactis</i>	61
b)	<i>Lactobacillus plantarum</i> LMAX	61
c)	<i>Escherichia coli</i>	62
d)	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	62
e)	<i>Listeria monocytogenes</i> EGDe <i>lux</i>	62
II.2	Biologie moléculaire	66
II.2.1	Gènes synthétiques	66
II.2.2	Réaction de polymérisation en chaîne	66
II.2.3	Construction des plasmides	69
II.2.4	Préparation de bactéries compétentes et électroporation	71
a)	<i>Lactococcus lactis</i> NZ9000	71
b)	<i>Escherichia coli</i> DH5 α	71
c)	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	72
II.2.5	Extraction d'ADN plasmidique et génomique	73
a)	Extraction d'ADN plasmidique chez <i>L. lactis</i>	73
b)	Extraction d'ADN total de la souche <i>Lactobacillus plantarum</i> LMAX	73
c)	Extraction d'ADN plasmidique chez <i>E. coli</i>	74
II.3	Production hétérologue de la pédiocine	74
II.3.1	Préparation des <i>starters</i>	74
II.3.2	Production en flacon de 250 mL	74
II.3.3	Production en fermenteur de 2 L	74

II.4	Analyse de pédiocines recombinantes	76
II.4.1	ELISA	76
a)	Anticorps primaires	76
b)	Protocole ELISA	77
II.4.2	Dosage de l'activité antibactérienne par diffusion en milieu gélosé .	78
II.4.3	tricine-SDS-PAGE et gel d'activité	79
a)	Précipitation au sulfate d'ammonium	79
b)	Gel de tricine-SDS-PAGE	79
II.4.4	Spectrométrie de masse par MALDI-TOF	79
II.5	Purification sur colonne IMAC	80
II.5.1	Préparation des échantillons et des tampons	80
II.5.2	Purification de la H-Rpédiocine par IMAC en utilisant un système de chromatographie basse pression	80
II.6	Analyse de séquences	80

Chapitre III	
Résultats	81

III.1	Mise au point d'un système d'expression hétérologue	81
III.1.1	Introduction	81
III.1.2	Choix de l'hôte : <i>Lactococcus lactis</i>	81
III.1.3	Choix d'un peptide signal permettant la sécrétion de la pédiocine recombinante Rpédiocine <i>via</i> le système Sec de <i>L. lactis</i>	82
III.1.4	Choix d'un système d'expression	82
a)	Promoteur constitutif	83
b)	Promoteur inductible : système NICE	83
III.1.5	Choix du vecteur d'expression	83
III.1.6	Construction d'une souche permettant la sécrétion d'une pédiocine recombinante <i>via</i> le système Sec de <i>L. Lactis</i> NZ9000	84
III.1.7	Choix d'une souche indicatrice permettant d'évaluer la production des dérivés de la pédiocine	86
a)	Construction de la souche indicatrice	86
b)	Construction d'une souche résistante aux dérivés de la pé- diocine.	87
III.1.8	Condition optimale d'induction de la production de Rpédiocine par <i>L. lactis</i> NZ9000_pSec::rpedA	87

III.2 Optimisation de la sécrétion de la pédiocine recombinante	88
III.2.1 Impact des pro-peptides SD et LEISSTCDA sur la sécrétion de pédiocines recombinantes	88
a) Clonage des dérivés de la pédiocine S-Rpédiocine et L- Rpédiocine	88
b) Production en flacon de 250 mL des pédiocines recombi- nantes	89
III.2.2 Conséquences des peptides SD et LEISSTCDA sur l'activité anti- bactérienne	90
a) Test d'activité sur gélose	90
b) Détection des pédiocines sur gel de tricine	91
c) Concentration minimale inhibitrice	92
III.3 Amélioration du potentiel antibatérien de la pédiocine recombinante	93
III.3.1 Introduction	93
III.3.2 Statut des ponts disulfures de la pédiocine	94
a) Construction d'un vecteur permettant d'exprimer la pro- téine H-Rpédiocine	94
b) Production et purification de la H-Rpédiocine	95
c) Analyse du statut des ponts disulfures de la protéine H- Rpédiocine par MALDI-TOF	97
III.3.3 <i>Lactococcus lactis</i> ML3	100
III.3.4 Analyses <i>in silico</i> : hypothèse quant au rôle potentiel de PedC . . .	100
III.3.5 Co-production des dérivés recombinants de la pédiocine avec PedC	103
III.3.6 Recherche <i>in silico</i> d'homologues de la protéine PedC	105
III.4 Expression hétérologue de la pédiocine chez <i>Carnobacterium maltaromati-</i> <i>cum</i> DSM20730	108
III.4.1 Introduction	108
III.4.2 Résultats	109

Chapitre IV

Discussion & Perspectives

111

IV.1 Évaluation d'un système d'expression hétérologue	112
IV.1.1 <i>Lactococcus lactis</i>	112
IV.1.2 <i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	112
IV.1.3 Promoteur constitutif et promoteur inductible	113

IV.1.4 Croissance de la <i>L. lactis</i> en condition d'induction	115
a) Production de dérivés recombinants de la pédiocine en fla- con de 250 mL	115
b) Production des dérivés recombinants de la pédiocine en fermenteur de 2L	115
IV.1.5 Sécrétion des pédiocines recombinantes	116
IV.2 Conséquence de la fonctionnalisation	117
IV.2.1 Analyse des dérivés recombinants de la pédiocine sur gel de tricine SDS-PAGE	117
IV.2.2 Concentration minimale inhibitrice des dérivés recombinants de la pédiocine	118
IV.3 Étude du statut des ponts disulfures des dérivés recombinants de la pédiocine	118
IV.3.1 Purification de la H-Rpédiocine par chromatographie d'affinité . . .	118
IV.3.2 Analyse du statut des ponts disulfures de la H-Rpédiocine	119
IV.3.3 Recherche d'une protéine responsable de la formation des ponts disulfures de la pédiocine PA-1	119
IV.3.4 Impact de la co-production de PedC sur la productivité spécifique de la pédiocine recombinante et de ses dérivés	120
IV.3.5 Effet de la protéine PedC sur l'activité des pédiocines recombinantes	121
IV.3.6 Recherche d'homologues de la protéine PedC	122

Conclusion générale et perspectives	123
--	------------

Annexes

Annexe A Carte des plasmides pSec::<i>nucB</i>, pOri23 et de leurs dérivés.	125
--	------------

Annexe B Combining propeptide fusion and co-expression with PedC	135
---	------------

Bibliographie	157
----------------------	------------

Avant-Propos

Les bactériocines sont des protéines antibactériennes produites par des bactéries et synthétisées par voie ribosomique (RILEY 2009). Elles sont utilisées dans les aliments comme bio-conservateurs et ont également été proposées comme alternative pour le traitement d'infections liées à des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques (DOBSON *et al.* 2012).

L'étude du mécanisme d'action des bactériocines requiert d'importantes quantités de protéines. De plus, l'utilisation industrielle de ces molécules doit satisfaire à des impératifs de rendement nécessitant la mise au point de procédés de production et de purification efficaces. Cependant, la faible productivité des producteurs naturels, ainsi que de faibles rendements de purification rendent difficile une utilisation à grande échelle (GUYONNET *et al.* 2000 ; JACK *et al.* 1996 ; JASNIEWSKI *et al.* 2008c).

L'expression hétérologue est une stratégie efficace pour augmenter les rendements de production d'une protéine. L'hôte choisi pour cette étude est *Lactococcus lactis*, car cette bactérie lactique a précédemment été utilisée avec succès pour la production de bactériocines (RODRÍGUEZ *et al.* 2003), dont la pédiocine PA-1 (ARQUÉS *et al.* 2008 ; HORN *et al.* 1999, 2004 ; MARTÍN *et al.* 2007a ; REVIRIEGO *et al.* 2005, 2007b) et peut être envisagée comme un hôte pour la production et la purification de bactériocines à grande échelle. *Lactococcus lactis* étant une bactérie "*Generally Recognized As Safe*", elle est aussi un hôte intéressant pour délivrer *in vivo* des bactériocines à des fins probiotiques (DOBSON *et al.* 2012 ; OSMANAGAOGLU *et al.* 2010 ; PONTES *et al.* 2011) ou pour la biopréservation des aliments (RENYE *et al.* 2011).

La pédiocine PA-1 est une bactériocine modèle de la sous-classe IIa produite par des bactéries des genres *Pediococcus* et *Lactobacillus*. Cette bactériocine possède une activité antibactérienne efficace sur des bactéries pathogènes et d'altération des aliments (PAPAGIANNI et ANASTASIADOU 2009). Elle est composée de 44 acides aminés, dont quatre cystéines qui sont impliquées dans la formation de deux ponts disulfures (HENDERSON *et al.* 1992). L'opéron de la pédiocine PA-1 est composé de 4 gènes nommés : *pedA* (ou *papA*), *pedB* (ou *papB*), *pedC* (ou *papC*) et *pedD* (ou *papD*). Ces quatre gènes codent

respectivement pour la pré-pédiocine PA-1, la protéine d'immunité de la pédiocine PA-1, une protéine accessoire de sécrétion et un ABC-transporteur impliqué dans l'export et le clivage du signal peptide de la pédiocine PA-1 (BUKHTIYAROVA *et al.* 1994; MARUGG *et al.* 1992; VENEMA *et al.* 1995). Plusieurs stratégies ont été explorées pour produire la pédiocine PA-1 chez *L. lactis* de façon hétérologue. L'une d'elle consiste à cloner l'ensemble de l'opéron de la pédiocine sous le contrôle du promoteur de la nisine A (RENYE et SOMKUTI 2010). Une autre stratégie, dont le but est d'améliorer la production globale de la bactériocine en améliorant la sécrétion, est de remplacer le peptide signal de la pédiocine PA-1 par le peptide signal de la protéine Usp45 ou par le peptide signal de l'entéroïne P, ce qui permet la sécrétion à travers le système Sec (LI *et al.* 2011; MARTÍN *et al.* 2007a).

L'objectif de cette thèse est d'optimiser les performances de production hétérologue de bactériocines de la classe IIa chez *L. lactis* en augmentant la productivité et en améliorant la fonctionnalité des protéines produites. Ces travaux de thèse ont été réalisés au sein du LIBio, laboratoire qui présente une expertise dans le domaine des bactéries de l'alimentation et la biopréservation. Un des axes de recherche de l'équipe porte notamment sur l'utilisation de procédés biologiques pour la production de bactériocines. Une thèse sur l'expression hétérologue de bactériocines utilisant *E. coli* comme hôte a précédemment été réalisée au sein de cette équipe (JASNIEWSKI *et al.* 2008c). L'utilisation de *L. lactis* comme nouveau modèle d'étude au laboratoire a nécessité d'établir, voire de mettre au point, un certain nombre de méthodes de génie génétique et de génie fermentaire adaptées à cette bactérie. Afin de doser rapidement et spécifiquement la pédiocine, un test ELISA a également été développé au laboratoire. Une partie non négligeable de cette thèse a ainsi été dédiée à la mise au point de méthodes robustes et à la capitalisation d'expériences afin que celles-ci puissent être utilisées par le laboratoire de façon pérenne.

Ce manuscrit est organisé en quatre chapitres :

- le premier chapitre est consacré à la revue bibliographique,
- le deuxième chapitre est dédié au matériel et aux méthodes,
- le troisième chapitre expose les résultats obtenus. Ce chapitre est séparé en quatre sections :
 1. La première est consacrée à la mise en place du système permettant la production hétérologue de la pédiocine recombinante par *L. lactis*.
 2. La deuxième section est consacrée à l'amélioration de ce système. Cette section décrit l'impact de deux pro-peptides greffés à l'extrémité N-terminale de la

pédiocine sur la productivité spécifique et le potentiel antibactérien de cette bactériocine.

3. La troisième section est vouée au rôle de la protéine PedC dans la maturation de pédiocine PA-1.
 4. La dernière section est dédiée à la production hétérologue de la pédiocine chez *Carnobactérium maltaromaticum* DSM20730.
- Le quatrième chapitre est consacré à la discussion des résultats obtenus au cours de cette thèse et aux perspectives.

Publications

Monnet C., Back A., Irlinger F. (2012) "*Growth of Aerobic Ripening Bacteria at the Cheese Surface Is Limited by the Availability of Iron*", Applied and Environmental Microbiology, volume 78, issue 9, page 3185-3192

Rahman A., Gleinser M., Lanhers M.C., Riedel C.U., Foligne B., Hanse M., Yen F.T., Klouj A., Afzal M.I., Back A., Mangavel C., Cailliez-Grimal C., Revol-Junelles A.M., Borges F. (2014) "*Adaptation of the lactic acid bacterium *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28 to the mammalian gastrointestinal tract : from survival in mice to interaction with human cells*", International dairy journal, volume 34, issue 1, page 93-99.

Back A. , Borges F., Mangavel C., Paris C., Emmanuel R., Romain K., Aymes A., Rogniaux H., Pavlović M., van Heel A. J., Kuipers O. P., Revol-Junelles A. M., Cailliez-Grimal C. (2014) "*Combining propeptide fusion and co-expression with *PedC* improves pediocin production in *Lactococcus lactis**" Applied Microbiology and Biotechnology, Soumise

Communications orales

Back A., Borges F., Revol-Junelles A. M., Cailliez-Grimal C. (4 et 6 juin 2014) "*Export optimization by N-terminus functionalization of recombinant pediocin expressed in *Lactococcus lactis**", 4th International Symposium on Antimicrobial Peptides, Lorient, France.

Communications affichées

Back A., Borges F., Cailliez-Grimal C. (2013) "*Expression de la pédiocine chez *Lactococcus lactis**", Séminaire de l'école doctorale RP2E, Janvier 2013, Nancy, France.

Table des figures

1	Structure de la nisine produite par <i>L. lactis</i>	5
2	Alignement des bactériocines de la sous-classe IIa	7
3	Organisation génétique des bactériocines de la sous classe IIa . . .	11
4	Transporteur ABC des bactériocines de la sous-classe IIa	13
5	Sécrétion de protéines <i>via</i> le système Sec	14
6	Régulation de la biosynthèse des bactériocines de la sous-classe IIa faisant appel à un système à trois ou deux composantes et à la détection du <i>quorum</i>	16
7	Structure tridimensionnelle des bactériocines de la sous-classe IIa.	17
8	Insertion des bactériocines de la sous-classe IIa dans la membrane bactérienne (sous-groupe 3)	20
9	Modèle d'insertion des bactériocines de la sous-classe IIa (sous- groupe 1 et 2) dans une membrane bactérienne	22
10	Modèles d'insertion des peptides antimicrobiens dans une bi- couche lipidique	25
11	Production hétérologue de bactériocine par <i>E. coli</i>	29
12	Sécrétion hétérologue des bactériocines chez les levures.	34
13	Système NICE chez <i>Lactococcus lactis</i> NZ9000.	37
14	Adressage de la nucléase NucA chez les bactéries lactiques	38
15	Sécrétion de bactériocines <i>via</i> le système Sec chez <i>L. lactis</i>	42
16	Formation des ponts disulfures chez <i>E. coli</i> <i>via</i> le système des Dsb	54
17	Modèle du Système Bdb chez <i>B. subtilis</i> 168	55
18	Procédé de production en fermenteur de 2 L	75
19	Anticorps anti-pédiocine PA-1	76
20	Exemple de courbe étalon utilisée pour doser les dérivés recom- binants de la pédiocine	78

21	Promoteurs testés pour l'expression hétérologue de gènes chez <i>L. lactis</i> NZ9000	82
22	Conformité de la séquence de l'insert du plasmide pSec:: <i>rpda</i>	84
23	Gènes codant des dérivés de la pédiocine	85
24	Concentration optimale de nisine permettant une production optimale de dérivés recombinants de la pédiocine chez <i>L. lactis</i> via le système NICE	88
25	Activité antibactérienne des dérivés recombinants de la pédiocine	91
26	SDS-PAGE en gel de tricine	92
27	Combinaison possible des ponts disulfures chez la pédiocine PA-1	94
28	Masses attendues des peptides comportant une cystéine après digestion tryptique de la H-Rpédiocine	98
29	Spectre MALDI-TOF de la H-Rpédiocine digérée par la trypsine	99
30	Analyse <i>in silico</i> des protéines PedB, PedC et PedD	101
31	Analyse <i>in silico</i> du peptide signal de PedC	102
32	Activité des dérivés de la pédiocine co-produits avec PedC	104
33	Structure génétique des clusters de gènes codant pour des bactériocines de la sous-classe IIa et contenant un homologue de la protéine PedC	108
34	Carte du plasmide pRSN <i>pedA</i>	109
35	Expression de l'opéron <i>pedABCD</i> via le promoteur P ₃₂	114
A.1	Plasmide pSec:: <i>nucB</i>	126
A.2	Plasmide pSec:: <i>rpda</i>	127
A.3	Plasmide pSec:: <i>l-rpda</i>	128
A.4	Plasmide pSec:: <i>s-rpda</i>	129
A.5	Plasmide pSec:: <i>h-rpda</i>	130
A.6	Plasmide pOri23	131
A.7	Plasmide pOri:: <i>pedB</i>	132
A.8	Plasmide pOri:: <i>pedC</i>	133

Liste des tableaux

1	Classification des bactériocines	3
2	Étiquettes de solubilisation utilisées pour la production hétérologue de bactériocines de la sous-classe IIa chez <i>E. coli</i>	31
3	Production hétérologue de bactériocines chimériques chez <i>L. lactis</i>	40
4	Production hétérologue de bactériocines chez des bactéries autre que <i>L. lactis</i> et <i>E. coli</i>	44
5	Purification de bactériocines produites sans étiquette de purification dans le milieu de culture	47
6	Etiquettes d'affinité utilisées pour la purification de protéines recombinantes	50
7	Souches utilisées	63
8	Amorces et produits de PCR.	68
9	Plasmides utilisés	70
10	Croissance des souches produisant les pédiocines recombinantes .	89
11	Production des dérivés de pédiocines	90
12	Concentration minimale inhibitrice	93
13	Production de la H-Rpédiocine et croissance de la souche <i>L. lactis</i> NZ9000_pSec::h-rpedA	96
14	Productivité spécifique et CMI des pédiocines recombinantes co-produites avec la protéine PedC	103
15	Homologie de séquence entre PedC, des TDOR et des protéines appartenant à la famille des protéines PedC_BrcD	106
16	Activité antibactérienne produite par les souches <i>L. lactis</i> ML3 et <i>C. maltaromaticum</i> DSM20730_pRSNpedA	110

Liste des Abréviations

ABC	<i>ATP Binding Cassette</i>
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine triphosphate
CMI	concentration minimale inhibitrice
DPC	dodecylphosphocholine
DTS	système de transport dédié
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
GRAS	<i>generally recognized as safe</i>
HIC	chromatographie d'interaction hydrophobe
HPK	protéine histidine kinase
HRP	peroxydase de raifort
IF	facteur d'induction
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LMA	laboratoire de microbiologie alimentaire
LPS	lipopolysaccharides
MALDI-TOF	spectromètre de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice et un analyseur à temps de vol
IMAC	<i>immobilized-metal affinity Chromatography</i>
MBP	protéine de liaison au maltose
MFα1	facteur α
$\mu_{\max}$	taux de croissance maximum spécifique

NICE	<i>nisin controlled gene expression</i>
NucB	nucléase B de <i>Staphylococcus aureus</i>
PBS	tampon phosphate salin
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
pI	point isoélectrique
RMN	résonance magnétique nucléaire
P_{nisA}	promoteur de la nisine A
RR	protéine de régulation
RP-HPLC	chromatographie en phase liquide à haute performance en phase inverse
TDOR	thiol-disulfide oxydoréductase
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine sodium dodécylsulfate
SDS	<i>sodium dodécylsulfate</i>
tricine-SDS-PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium et de tricine
Sec	<i>secretion system complex</i>
SP_{EntP}	peptide signal de l'entéroline P
SP_{HirJM79}	peptide signal de l'hiracine JM79
SP_{LcnA}	peptide signal de la lactococcine A
SP_{Usp45}	peptide signal de la protéine Usp45
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
TFE	2,2,2-trifluoroéthanol
Usp45	<i>unknown secreted protein of 45 kDa</i>
VKOR	vitamine K époxyde oxydoréductase

Chapitre I

Synthèse Bibliographique

I.1 Les Bactériocines

Tous les organismes vivants produisent des peptides antimicrobiens, chez les bactéries ces peptides, lorsqu'ils sont synthétisés par voie ribosomique, s'appellent des bactériocines. Le rôle des bactériocines est d'inhiber le développement d'autres micro-organismes. L'homme les utilise pour la conservation des aliments, consciemment ou inconsciemment depuis l'Antiquité. Cependant, ce n'est qu'en 1877 que Louis Pasteur et François Joubert ont décrit le premier effet inhibiteur d'une souche sur une autre souche et il semble qu'une bactériocine était responsable de cet effet (PASTEUR 1877; RILEY 2009). C'est en 1925 que la première bactériocine a été isolée et décrite à partir d'un surnageant d'*Escherichia coli* (GRATIA 1925). Actuellement, cette bactériocine est connue sous le nom de microcine V (RILEY 2009). La "*N inhibitory substance*" (nisine) produite par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* est la première bactériocine produite par une bactérie gram-positive à avoir été identifiée (MATTICK et HIRSCH 1947; ROGERS et WHITTIER 1928; WHITEHEAD 1933). Elle est aujourd'hui la seule bactériocine qui peut être utilisée directement dans les aliments comme additif alimentaire (E234) (COTTER *et al.* 2005b). Le sujet de cette thèse étant la pédiocine PA-1, une bactériocine produite par des *Pediococci* et des *Lactobacilli* qui sont des bactéries gram-positives, seules les généralités et les propriétés des bactériocines des bactéries gram-positives seront traitées.

I.1.1 Définition

Les bactériocines sont définies comme étant des peptides ou des protéines antibactériennes produites par des bactéries gram-positives (immunisées contre la bactériocine qu'ils produisent *via* une protéine d'immunité) et synthétisées par voie ribosomique (COTTER *et al.* 2005a).

I.1.2 Classification des bactériocines produites par les bactéries gram-positives

La première classification des bactériocines proposée est basée sur leur spectre d'action (KLAENHAMMER 1988), la seconde classification est fondée sur les structures et les mécanismes d'action des bactériocines (KLAENHAMMER 1993). Cette dernière subdivise les bactériocines en 4 classes décrites ci-dessous. Elle a été utilisée comme base pour établir les nouvelles classifications (Tableau 1 ; COTTER *et al.* 2005a ; DRIDER *et al.* 2006 ; NES *et al.* 1996 ; REA *et al.* 2011).

Tableau 1 – Classification des bactériocines adaptée de la classification de REA et al. 2011.

Classe		Sous-classe	
Classe I	Peptides (< 10 kDa) modifiés après la traduction, thermorésistants	Sous-classe Ia	Peptides contenant de la lanthionine, β -méthyl-lanthionine et des résidus déshydratés.
		Sous-classe Ib	Peptides contenant de la labionine
		Sous-classe Ic	Peptides comptant des atomes de soufre liés à des atomes de carbone
Classe II	Peptides (< 10 kDa), peu modifiés, thermorésistants	Sous-classe IIa	Peptides ayant une activité anti- <i>Listeria</i> et ayant une séquence <i>consensus</i> (YGNGVXCXK/NXXC) en N-terminal
		Sous-classe IIb	L'activité optimale de la bactériocine dépend de la présence de deux peptides
		Sous-classe IIc	Les extrémités N- et C-terminales sont liées après la traduction par une enzyme
		Sous-classe IId	Peptides de la classe II ne pouvant être classés dans les autres classes
Classe III	Protéines (> 10 kDa), thermosensibles	Sous-classe IIIa	Protéines lytiques
		Sous-classe IIIb	Protéines non-lytiques
Classe IV	Bactériocines possédant une composante lipidique ou glycosydique		

a) Classe I

Les bactériocines de la classe I sont des peptides (< 10 kDa) thermorésistants modifiés post-traductionnellement. Les gènes impliqués dans la synthèse de ces bactériocines sont localisés sur le chromosome bactérien (*e. g.* subtiline), sur des transposons (*e. g.* nisine) ou sur des plasmides (*e. g.* épidermine) (KUIPERS *et al.* 2011). Tous les gènes impliqués dans la biosynthèse (*lanBC*, *lanM* et *lanL*), l'immunité (*lanI*, *lanEFG*), la régulation (*lanRK*), l'export (*lanPT*) et le gène codant la pré-bactériocine (*lanA*) peuvent être organisés en un ou plusieurs opérons (KUIPERS *et al.* 2011 ; NES 2011). Dans les premières classifications, la classe I ne comporte que les lantibiotiques ("*lanthionine containing antibiotics*") (KLAENHAMMER 1993 ; NES *et al.* 1996). Avec la découverte de nouvelles classes de bactériocines modifiées post-traductionnellement (*i. e.* labyrinthopeptine, sactibiotique), la classification des bactériocines modifiées post-traductionnellement a été révisée :

- Sous-classe Ia (lantibiotique) : la sous-classe Ia regroupe des peptides antimicrobiens appelés les lantibiotiques (*e. g.* nisine A, subtiline). Ils contiennent des acides aminés modifiés post-traductionnellement (*i. e.* lanthionine, β -méthyl-lanthionine, déshydroalanine, déshydrobutyrine ; Figure 1) (REA *et al.* 2011). Trois façons de classer les lantibiotiques ont été proposées :
 1. Une classification basée sur la similarité des peptides signaux (COTTER *et al.* 2005a ; PIPER *et al.* 2009) permet de diviser les lantibiotiques en 12 sous-types.
 2. Plusieurs enzymes étant responsables de leur maturation, une classification selon ce critère a été établie (WILLEY et DONK 2007) :
 - i. Dans la première sous-classe, la déshydratation des résidus thréonine et serine est réalisée par l'enzyme LanB, la formation des ponts thioéthers est réalisée par l'enzyme LanC, l'export est assuré par un ABC-transporteur (LanT) et le peptide signal est excisé par LanP.
 - ii. Dans la sous-classe II, une seule enzyme est responsable de la déshydratation et de la formation des ponts thioéthers (LanM). Ici, l'excision et l'export se font *via* la même enzyme (LanT).
 - iii. Il existe une troisième et une quatrième sous-classe regroupant des "*lantibiotic-like peptides*". Ces peptides n'ont pas d'activité antibactérienne connue. Ils sont modifiés par des enzymes homologues de LanC, LanB, LanM.
 2. Une autre classification par type a été basée sur le mode d'action et la structure des lantibiotiques. Le type A regroupe des lantibiotiques ayant une structure

linéaire et le type B des lantibiotiques globulaires. Les lantibiotiques du type C sont des lantibiotiques dont l'activité optimale dépend de la présence de deux peptides (*e. g.* lacticin 3147) (REA *et al.* 2011).

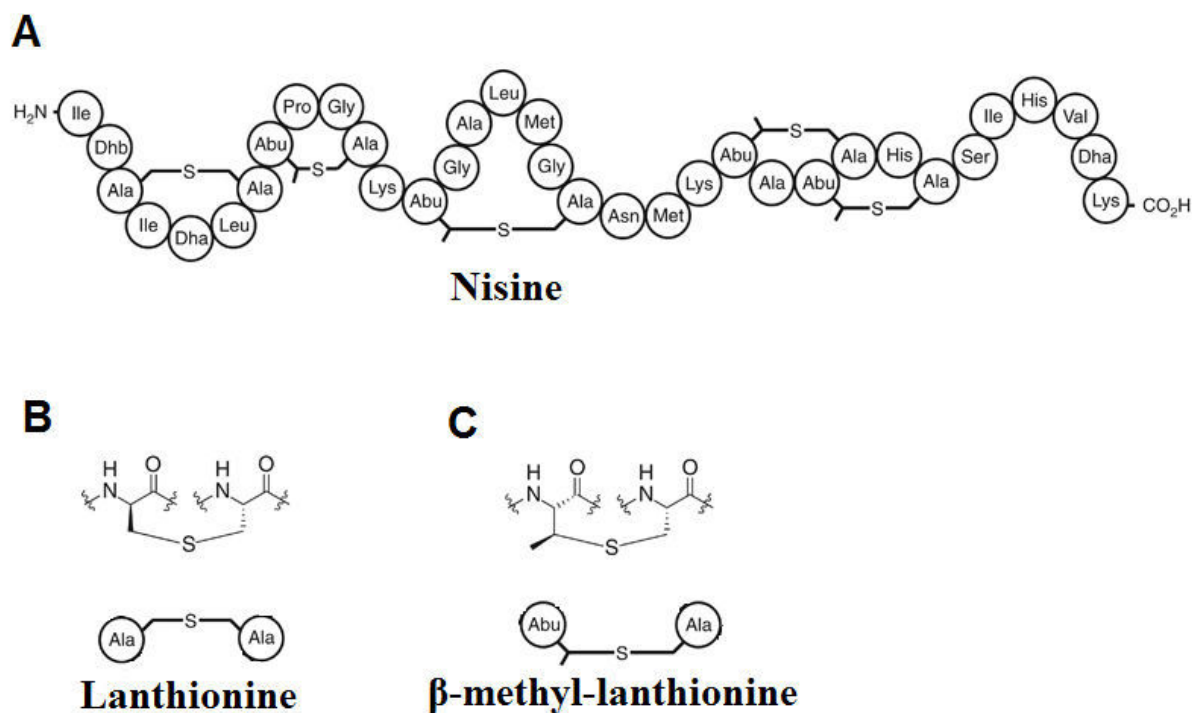


FIGURE 1 – Structure de la nisine (A) produite par *L. lactis* ; structure des résidus d'acide aminé inhabituels : lanthionine (B) et β -methyl-lanthionine (C) adapté de LOHANS et VEDERAS 2014

- Sous-classe Ib (labyrinthopeptine) : les peptides de cette classe sont aussi appelés les labyrinthopeptines (MEINDL *et al.* 2010). Ces bactériocines possèdent un acide aminé carbocyclique particulier, la labionine (*e. g.* labyrinthopeptine A2).
- Sous-classe Ic (sactibiotique) : cette classe est caractérisée par des bactériocines ayant au moins une cystéine dont l'atome de soufre est lié au carbone α d'un autre acide aminé (*e. g.* thuricine CD, subtilosine A) (REA *et al.* 2011).

b) Classe II

Les bactériocines de la classe II sont des peptides (< 10 kDa) thermorésistants peu modifiés après la traduction (EIJNSINK *et al.* 2002). Cette classe a été subdivisée en 4 sous-classes :

1. La sous-classe IIa (ou "*pediocin-like bacteriocins*") regroupe des peptides ayant une activité anti-*listeria* et une séquence *consensus* YGNGVXCXK/NXXC en N-terminal (COTTER *et al.* 2005a ; NISSEN-MEYER *et al.* 2009). Cette sous-classe a été subdivisée en 4 sous-groupes selon les similarités et les différences des domaines C-terminaux (Figure 2 ; NISSEN-MEYER *et al.* 2009). C'est dans cette classe que se trouve la pédiocine PA-1.
2. La sous-classe IIb est composée de bactériocines à deux composantes, c'est-à-dire que leur activité optimale dépend de l'action conjuguée de deux peptides (*e. g.* thermophiline 13, brochocine C). Ceux-ci peuvent être actifs indépendamment l'un de l'autre mais une synergie d'action est observée quand les deux peptides sont présents (NISSEN-MEYER *et al.* 2009 ; OPPEGÅRD *et al.* 2007). Les bactériocines de cette classe semblent avoir un motif *consensus* GxxxG nécessaire à l'activité antimicrobienne (SENES *et al.* 2004). Les similarités du motif GxxxG ont été utilisées pour diviser les bactériocines de cette classe en deux sous-groupes A et B (NISSEN-MEYER *et al.* 2009).
3. Initialement, dans la classification de KLAENHAMMER 1993, la sous-classe IIc regroupait des bactériocines activées par réduction de groupements thiols. Il a par la suite été proposé d'y regrouper les bactériocines sécrétées par le système général de sécrétion des bactéries (*secretion system complex* ; système Sec) (NES *et al.* 1996). Dans l'une des dernières classifications, cette sous-classe regroupe les bactériocines cycliques (*e. g.* carnocyclin A, gassericin A, uberolysin) (COTTER *et al.* 2005a) dont la circularisation est catalysée par une cyclase qui lie l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale (MAQUEDA *et al.* 2008). Il a aussi été envisagé de créer une classe V spécifique des bactériocines cycliques (GABRIELSEN *et al.* 2014 ; KEMPERMAN *et al.* 2003). Les bactériocines de cette sous-classe sont divisées en deux sous-groupes selon leurs propriétés physico-chimiques et les similarités de leur séquence protéique (GABRIELSEN *et al.* 2014).
4. La sous-classe IIId (ou "*non-pediocin-like peptide*") : regroupe des bactériocines de la classe II qui ne peuvent pas être placées dans les autres sous-classes (*e. g.* thuricin 17, leucocine Q, aureocine A53) (COTTER *et al.* 2005a ; NISSEN-MEYER *et al.* 2009).

		10	20	30	40	50
Sous-groupe 1	Entéroccine A	TTHSGKYYGNGVYCTRNKCTVDWAKATTCTAGMSIGGFLLGGAIFG~~KC				
	Divercine V41	~~~~TKYYGNGVYCNSSKKCWVDWGQASGCIGQTVVGGWLGGAIIFG~~KC				
	Divergicine M35	~~~~TKYYGNGVYCNSSKKCWVDWGTAQGCII~~VVIGQLGGGIEGKGKC				
	Coaguline A	~~~~KYYGNGVTCGKHSCSVLDWGKATTCTIINNGAMAWATGGHQGTHKC				
	Pédiocine PA-1	~~~~KYYGNGVTCGKHSCSVLDWGKATTCTIINNGAMAWATGGHQGNHKC				
	Piscicocine CS526	~~~~KYYGNGLSXNKKGXTVLDWGTAGIIGNNAANXATGGAAGXNK				
	Sakacine P	~~~~KYYGNGVHCGKHSCTVLDWGTAGIGNNNAANWATGGNAGWNK				
	Listériocine 743A	~~~~KSYGNGVQCNKKCWVDWGSIAISTIGNNSAANWATGGAAGWKS				
	Mundticine KS	~~~~KYYGNGVSCNKKGCSVDWGKAIGIIGNNSAANLATGGAAGWKS				
	Mundticine	~~~~KYYGNGVSCNKKGCSVDWGKAIGIIGNNSAANLATGGAAGWKS				
	Piscicoline 126	~~~~KYYGNGVSCNKGCTVDWSKAIGIIGNNAANLTTGGAAGWNKG				
	Sakacine 5X	~~~~KYYGNGLSCNKS GC SVLDWSKAISIIGNNAVANLTTGGAAGWKS				
Leucocine C	~~~~KNYGNGVHCTKRGCSVDWGYAWTNIANNSSVMNGLTGGNAGWHN					
Sous-groupe 2	Lactococcin MMFII	~~~~TSYGNGVHCNKS KCWIDVSELETYKAGTVSNPKDIIW				
	Leucocine A	~~~~KYYGNGVHCTKSGCSVNWGEAFSAGVHRLANGGNGFW				
	Mesentericin Y105	~~~~KYYGNGVHCTKSGCSVNWGEAASAGLHRLANGGNGFW				
	Sakacine G	~~~~KYYGNGVSCNSHGC SVNWGCQAWTCGVNHLANGGHVC				
	Plantaricine C19	~~~~KYYGNGLSCSKKGCTVNWGCQAFSCGVNRVATAGHGK				
	Plantaricine 423	~~~~KYYGNGVTCGKHSCSVNWGCQAFSCSVSHLANFGHGKC				
Sous-groupe 3	Curvacine A	~~~~ARSYGNGVYCNKKCWVNRGEATQSIIGGMISGWASGLAGM				
	Carnobactériocine BM1	~~~~AISYGNGVYCNKEKCWVNKAENKQAITGIVIGGWASSLAGMGH				
	Entéroccine P	~~~~ATRSYGNGVYCNSSKCWVNWGEAKENIAGIVISGWASGLAGMGH				
Sous-groupe 4	Bactériocine 31	~~~~ATYYGNGLIYCNKQKCWVDWNKASREIGKIIVNGVNHGFWAPR				
	Bactériocine RC714	~~~~ATYYGNGLIYCNKEKCWVDWNQAKGEIGKIIVNGVNVHGFWAP				
	Bactériocine T8	~~~~TYYGNGLIYCNKEKCWVDWNQAKGEIGKIIVNGVNVH				
	Pénocine A	~~~~KYYGNGVHCGKKT CYVDWGQATASIGKIIVNGWTQHGFWAHR				
	Entéroccine SE-K4	~~~~ATYYGNGVYCNKQKCWVDWSRARSEIIDRGVKAYVNGFTKVLGGIGGR				
	Carnobactériocine B2	~~~~VNYGNGVSCSKTKCSVNWGCQAFQERYTAGINSEFVSGVASGAGSIGRRP				

FIGURE 2 Alignement des bactériocines de la sous-classe IIa d'après NISSEN-MEYER *et al.* 2009. La classification en 4 sous groupes est basée sur les similarités et les différences des domaines C' terminaux. Les résidus asparagines (N), aspartates (D), glutamines (Q) et glutamates (E) sont en vert; les résidus isoleucines (I), leucines (L) et valines (V) sont en violet; les résidus tryptophanes (W), tyrosines (Y) et phénylalanines (F) sont en noir; les résidus cystéines (C) sont en gris foncé; les résidus alanines (A) et glycines (G) sont en orange; les résidus arginines (R), lysines (K) et histidines (H) sont en bleu pâle; les résidus prolines (P) sont en gris clair; les résidus méthionines (M) sont en bleu foncé. La position 22 est une position charnière caractérisée par la présence d'un résidu D/N. Cette région charnière sépare la région N-terminale de la région C-terminale.

c) Classe III

Les bactériocines de la classe III sont des protéines (> 10 kDa) thermosensibles. Cette classe a été divisée en deux sous-classes selon leur mécanisme d'action (BAKKAL *et al.* 2012) :

1. La sous-classe IIIa est composée de bactériolysines qui induisent l'hydrolyse du peptidoglycane de la bactérie cible (*e. g.* lysostaphine, zoocine A, entérolysine A).
2. La sous-classe IIIb est composée de protéines dont l'activité antimicrobienne n'implique pas la lyse de la bactérie cible (*e. g.* Helvecitin J).

d) Classe IV

Il existe une classe IV (KLAENHAMMER 1993) qui regroupe des bactériocines couplées à une partie non protéique (lipide, oligosaccharide). De nos jours, son existence est contestée car il semble n'y avoir aucune preuve concrète de l'existence de ces bactériocines (COTTER *et al.* 2005a). Cependant, il a été montré récemment que la sublancine 168, produite par *Bacillus subtilis* 168, est glycosylée au niveau du groupement thiol de l'une de ses cinq cystéines (STEPPER *et al.* 2011). Avant cette découverte, cette bactériocine était considérée comme un lantibiotique. Cette découverte remet donc en cause sa classification.

I.1.3 Applications des bactériocines

a) Application en agroalimentaire

De nos jours, les bactériocines sont utilisées sciemment ou non dans les produits fermentés. On dénombre trois façons d'ajouter des bactériocines dans les aliments dans un but de conservation (COTTER *et al.* 2005a) :

1. Elles peuvent être produites directement dans l'aliment *via* une bactérie qui fait partie de la flore alimentaire (HOLZAPFEL *et al.* 1995).
2. Elles peuvent être ajoutées directement dans l'aliment. A ce jour, seul la nisine A peut être ajoutée sous forme purifiée ou semi-purifiée (Nisaplin, Dupont-Danisco, Copenhagen, Denmark).
3. La souche productrice peut être ajoutée comme ingrédient sous forme de ferment. A notre connaissance, le seul exemple est la pédiocine PA-1 produite par *Pediococcus*

acidilactici (ALTA 2431, Quest International, Sarasota, Florida, USA) (RODRÍGUEZ *et al.* 2002), ou par *Lactobacillus plantarum* (HOLDBAC®, Dupont-Danisco, Copenhagen, Denmark)

Avec le rejet de plus en plus croissant des consommateurs quant aux conservateurs alimentaires chimiques, les bactériocines apparaissent comme des bio-conservateurs naturels attractifs car elles sont synthétisées par voie biologique (ABEE *et al.* 1995; CLEVELAND *et al.* 2001; CUI *et al.* 2012; ENNAHAR *et al.* 1999).

b) Applications médicales

Avec l'apparition de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques (FRENCH 2010; NEU 1992), l'utilisation directe des bactériocines en santé humaine ou vétérinaire est envisagée. De nombreuses études ont démontré le fort potentiel clinique des bactériocines comme anti-infectieux et deux bactériocines ont fait l'objet de brevets pour de telles applications. En santé humaine, Biosynexus Incorporated (Gaithersburg, USA) développe sous licence l'utilisation de la lysostaphine pour traiter des infections aux staphylocoques et la nisine A pour traiter des infections cutanées. En santé vétérinaire, ImmuCell Corporation (Portland, USA) développe une infusion à base de nisine appelée Mast Out® pour traiter les mammites chez la vache (COTTER *et al.* 2013).

La plupart des études sur l'utilisation clinique des bactériocines concernent les lantibiotiques. Pour évaluer leur potentiel comme médicament, des tests d'activité ont été réalisés sur des souches pathogènes résistantes aux antibiotiques. Il a été montré que la lacticine 3147, Pep5, la nisine A et leurs variants modifiés par ingénierie sont efficaces pour inhiber la croissance de *Staphylococcus aureus* (dont des souches résistantes à la méticilline), d'entérocoques (dont des souches résistantes à la vancomycine), des streptocoques, des *Clostridia* et des *Propionibacteria* (GALVIN *et al.* 1999; PIPER *et al.* 2009).

Le potentiel thérapeutique des lantibiotiques a aussi été évalué *in vivo*. Les premiers tests sur animaux ont démontré que les lantibiotiques comme la mersacidine peuvent permettre de traiter une infection aux staphylocoques dorés chez la souris (KRUSZEWSKA *et al.* 2004). Il a aussi été démontré, chez la souris, qu'une infection par *Streptococcus pneumoniae* pouvait être traitée par injection de nisine. En science vétérinaire, la lacticine 3147 s'est montrée efficace pour traiter des mammites chez la vache (RYAN *et al.* 1999).

L'utilisation clinique des bactériocines de la sous-classe IIa a aussi été évaluée. L'efficacité de la divercine RV41 produite par *Carnobacterium divergens* pour traiter une infection de *Listeria monocytogenes*, a été testée chez la souris. La divercine RV41, ainsi que des divercines V41 modifiées par génie génétique (modification d'acides aminés par

substitution) se sont montrées efficaces pour traiter une infection par *L. monocytogenes* (RIHAKOVA *et al.* 2010).

La nature protéique des bactériocines les rend incapables de diffuser librement dans les cellules du corps humain, c'est-à-dire qu'elles ne peuvent pas cibler des pathogènes intracellulaires comme *L. monocytogenes* ou *Mycobacterium tuberculosis* et qu'elles ne peuvent pas être administrées par voie orale (HEEL *et al.* 2011). Pour circonvenir ce problème, des bactériocines de la classe IIa ont été encapsulées dans des liposomes et leur capacité à cibler *M. tuberculosis* dans des macrophages de souris a été évaluée. Les résultats montrent que cette stratégie permet de réduire la charge de la bactérie *M. tuberculosis* dans les macrophages et de prolonger la vie des souris (SOSUNOV *et al.* 2007).

L'un des désavantages des bactériocines produites par les bactéries gram-positives est qu'elles ne ciblent pas les bactéries pathogènes gram-négatives. Pour résoudre ce problème, il est possible de combiner des antibiotiques avec ces bactériocines. Par exemple, il a été montré que le spectre ainsi que l'activité de la pédiocine PA-1 augmente lorsque celle-ci était utilisée en combinaison avec un antibiotique (la polymyxin E). Un effet synergique entre ces deux composants contre *L. monocytogenes* et *E. coli* a été décrit. (NAGHMOUCHI *et al.* 2010, 2011).

I.2 Bactériocines de la sous-classe IIa

I.2.1 Génétique des bactériocines de la sous-classe IIa

Les gènes nécessaires à la production des bactériocines de la sous-classe IIa sont organisés sous forme d'un ou de plusieurs opérons regroupés. Ces gènes peuvent être localisés sur le chromosome bactérien ou sur un plasmide. Généralement, quatre gènes sont nécessaires à la synthèse d'une bactériocine de classe II : un gène codant la pré-bactériocine (Figure 3 ; gène A), un gène d'immunité (Figure 3 ; gène B), un gène de sécrétion (Figure 3 ; gène D) et un gène de fonction mal connue et annoté comme codant une protéine accessoire de sécrétion (Figure 3 ; gène C). Le *locus* peut également comprendre jusqu'à 3 gènes impliqués dans la régulation de l'expression *via* un système à trois composants. Ces trois gènes codent une protéine histidine kinase (HPK), une protéine de régulation (RR), et un facteur d'induction (IF) (Figure 3 ; NES *et al.* 1996).

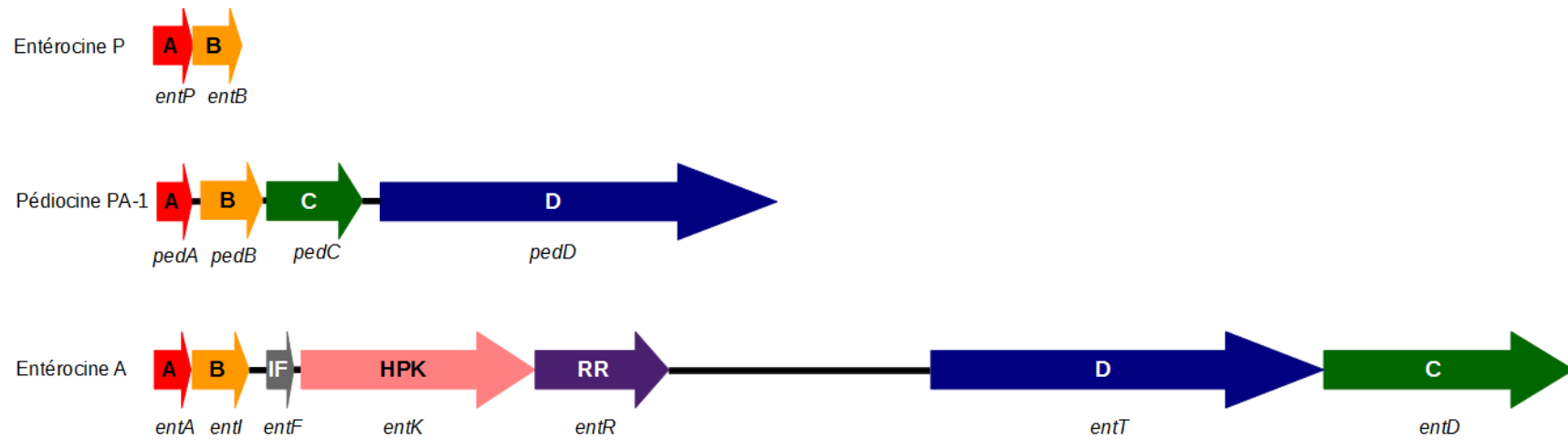


FIGURE 3 – Organisation génétique des bactériocines de la sous classe IIa adaptée de ENNAHAR *et al.* 2000. Locus regroupant les gènes impliqués dans la biosynthèse de l'entérocin P, de la pédiocine PA-1 et de l'entérocin A. Le gène A code pour la pré-bactériocine, le gène B code pour une protéine d'immunité, le gène C pour une protéine accessoire de sécrétion, le gène IF pour un pré-facteur d'induction, le gène HPK pour une Protéine Histidine Kinase, le gène RR pour une protéine de régulation, le gène D encode pour un transporteur ABC

I.2.2 Biosynthèse des bactériocines de la sous-classe IIa

Les bactériocines sont synthétisées par des ribosomes dans le cytoplasme de la bactérie productrice sous forme de pré-bactériocines composées de deux parties : le peptide signal et la bactériocine mature. Le peptide signal est indispensable à la sécrétion de la bactériocine. Il aurait deux rôles : en réduisant l'activité de la bactériocine, il protégerait la bactérie productrice jusqu'à l'export de cette dernière (après l'export de la bactériocine, la protéine d'immunité assure la protection de la bactérie productrice) et a également pour rôle l'adressage de la bactériocine vers le système de sécrétion (NES *et al.* 1996). Les peptides signaux des bactériocines de la sous-classe IIa sont du type double glycine, c'est-à-dire qu'ils sont caractérisés par la présence de deux glycines en amont du site de clivage du peptide signal. C'est au moment de l'export que le peptide signal est clivé (ENNAHAR *et al.* 2000 ; NES *et al.* 1996). Le peptide signal permet l'adressage vers un complexe protéique transmembranaire nommé système de transport dédié (DTS) impliqué dans la sécrétion de la bactériocine (Figure 4) ou par le système général de sécrétion (*Secretion System Complex*, Sec ; Figure 5) de la bactérie (NES *et al.* 1996).

Le DTS est composé d'un transporteur à ATP *Binding Cassette* (ABC) et, dans certains cas, d'une protéine accessoire de sécrétion. Le transporteur ABC a deux fonctions : l'export de la bactériocine après hydrolyse d'un adénosine triphosphate (ATP) en adénosine diphosphate (ADP) et l'excision du peptide signal. Les protéines accessoires de sécrétion qui font partie du DTS semblent être des homologues de la protéine HlyD (VENEMA *et al.* 1995). HlyD est une protéine d'*E. coli* dont le rôle est de faciliter la sécrétion de l'haemolysine A. Il est supposé que les protéines accessoires de sécrétion ont le même rôle pour toutes les bactériocines de la sous-classe IIa (VENEMA *et al.* 1995).

Certaines bactériocines de la classe IIa comme la divergicine A (WOROBO *et al.* 1995), l'acidocine B (LEER *et al.* 1995) et l'entérotoïne P (CINTAS *et al.* 1997) sont sécrétées *via* le système Sec de la bactérie productrice, qui permet l'export de protéines non-conformées. Dans ce système, le pore à travers la membrane est formé par le complexe protéique SecYEG. Ce complexe est aussi appelé translocase et est associé à SecA, une ATPase, qui fournit l'énergie nécessaire à l'export des protéines. Il existe deux mécanismes de sécrétion *via* ce système. Dans le premier, la protéine est synthétisée au contact de la machinerie de sécrétion et est exportée au fur et à mesure de sa synthèse par le ribosome. Dans le deuxième mécanisme, la protéine est synthétisée dans le cytoplasme et est ensuite prise en charge par les chaperonnes SecB, GroEL, DnaJ ou DnaK puis dirigée vers SecA. Au niveau de SecYEG, il y a hydrolyse d'un ATP par SecA, clivage du peptide signal et export de la protéine. La maturation de la protéine n'a lieu qu'après passage au travers de la membrane. L'acquisition de la conformation finale de la protéine est en compétition avec

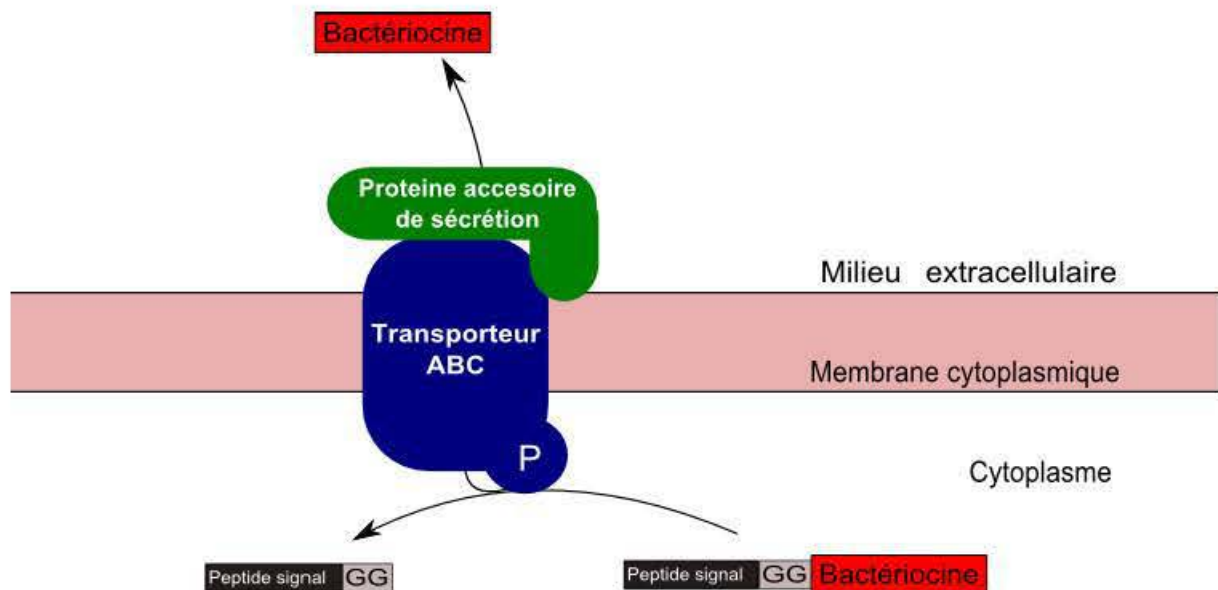


FIGURE 4 Transporteur ABC des bactériocines de la sous-classe IIa adapté de WANDERSMAN 1998. Dans le cytoplasme, la bactériocine est synthétisée sous la forme d'une pré-bactériocine possédant un peptide signal de type double glycine. Le peptide signal est reconnu par un domaine protéolytique (P) situé à l'extrémité du domaine N-terminal du transporteur ABC. Le rôle de ce domaine protéolytique est de cliver le peptide signal directement après ces deux glycines, ce qui permet l'export de la bactériocine dans le milieu extracellulaire. La sécrétion *via* ce système nécessite une protéine accessoire de sécrétion similaire à la protéine IlyD d'*E. coli* (VENEMA *et al.* 1995; WANDERSMAN 1998).

sa dégradation par des protéases. Cette compétition permet à la bactérie de sécréter de façon optimale des protéines correctement conformées. La maturation de la protéine peut être réalisée par des facteurs extracellulaires. Parmi les facteurs extracellulaires impliqués dans l'acquisition de la structure tertiaire de la protéine, on trouve les thiol-disulfides oxydoréductases (TDOR). Chez *B. subtilis*, il en existe 4 (BdbA, BdbB, BdbC et BdbD) impliqués dans la maturation des ponts disulfures des protéines sécrétées. Ces protéines sont soit localisées sur la face externe de la membrane soit transmembranaires. Après avoir acquises leur conformation finale, les protéines traversent la paroi. Celles qui ne la traversent pas suffisamment rapidement sont dégradées par des protéases (WELY *et al.* 2001).

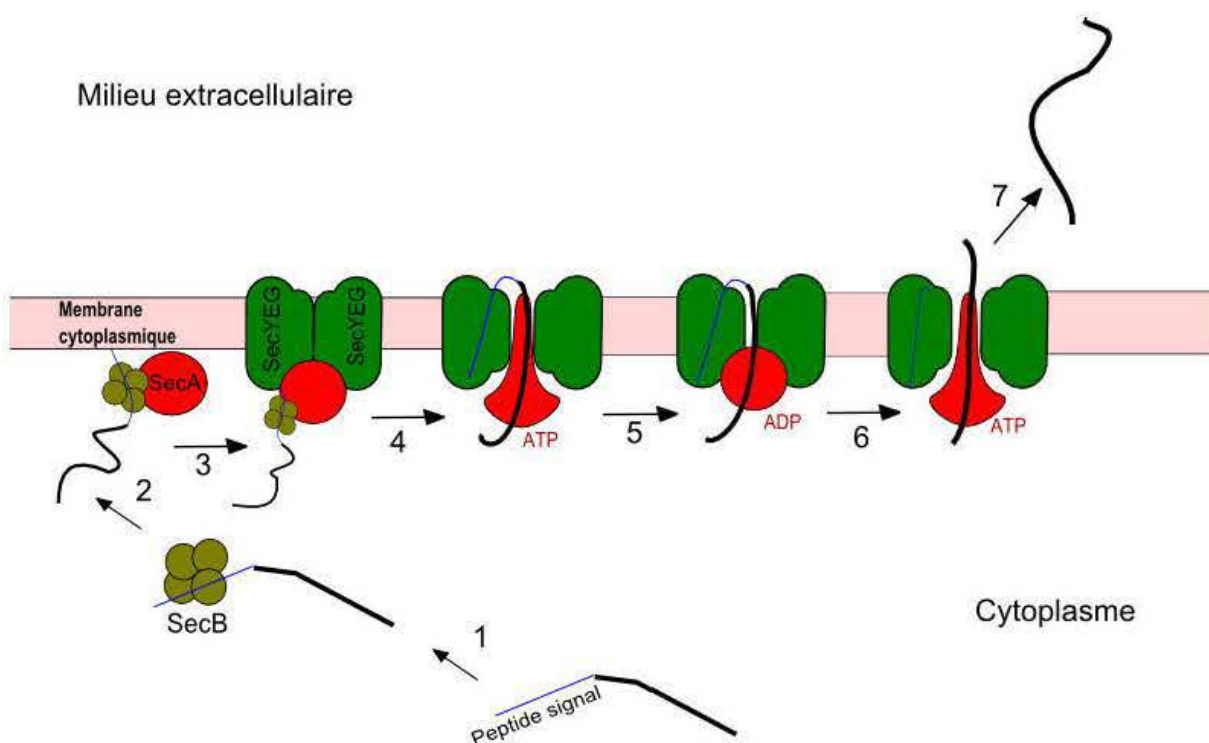


FIGURE 5 – Sécrétion de protéines *via* le système Sec adapté de MORI et ITO 2001. Les protéines qui sont sécrétées *via* le système Sec sont synthétisées dans le cytoplasme en fusion avec un peptide signal (1). Ce peptide signal est reconnu par une protéine chaperonne nommé SecB. SecB permet la liaison de la protéine au complexe SecYEG en se liant à l'ATPase SecA (2 et 3). L'engagement de la protéine dans le complexe SecYEG nécessite que SecA soit liée à un ATP (4). L'export et le clivage du peptide signal nécessitent l'hydrolyse de l'ATP en ADP (5, 6 et 7)

I.2.3 Régulation de la biosynthèse des bactériocines de la sous-classe IIa

Pour beaucoup de bactériocines de la sous-classe IIa, la régulation de la biosynthèse fait appel à un système à trois composants et à la détection du *quorum* (Figure 6). Il a été montré que le système est composé d'une IIPK transmembranaire, d'une protéine RR cytoplasmique et d'un IF. Dans ce système, l'IF s'accumule dans le milieu de culture pendant la phase de croissance de la bactérie jusqu'à une valeur seuil pour laquelle il y a activation de l'HPK. Une fois activée, l'HPK va en cascade activer l'expression des gènes permettant la biosynthèse de la bactériocine. L'activation des gènes de régulation conduit donc à une boucle d'auto-activation qui permet l'augmentation de la production de bactériocines (ENNAHAR *et al.* 2000). Seule la divercine V41 semble faire exception et être uniquement régulée par un système à deux composants; dans ce cas le facteur d'induction est la bactériocine elle-même (ENNAHAR *et al.* 2000; MÉTIVIER *et al.* 1998).

La régulation de la biosynthèse de la carnobacteriocine B2 fait appel à un système à trois composants mais aussi à un système à deux composantes. (ENNAHAR *et al.* 2000 ; KLEEREBEZEM *et al.* 2001 ; QUADRI 2003).

Il a été montré qu'il existait d'autres types de régulation n'utilisant pas la détection du *quorum*. Il semble que les facteurs environnementaux comme la température, la force ionique ou encore le pH soient également capables d'induire leur biosynthèse (CINTAS *et al.* 1997 ; DIEP *et al.* 2000 ; FIMLAND *et al.* 2000 ; GURSKY *et al.* 2006 ; LEROY et VUYST 1999).

Le système de régulation de la biosynthèse de certaines bactériocines reste encore inconnu. Par exemple, en ce qui concerne la pédiocine PA-1, il n'existe aucune régulation de la biosynthèse faisant appel à la détection du *quorum* (RODRÍGUEZ *et al.* 2002).

I.2.4 Rôle des différentes structures et régions des bactériocines de la sous-classe IIa

Les bactériocines de la classe II sont des peptides constitués d'environ 37 à 48 acides aminés. Elles ont une charge positive nette, avec des valeurs de point isoélectrique (pI) allant de 8 à 10 (DRIDER *et al.* 2006 ; NES *et al.* 1996), sont hydrophobes, thermostables et ne subissent pas ou peu de modifications post-traductionnelles (NES *et al.* 1996). Les études de résonance magnétique nucléaire (RMN) et de dichroïsme circulaire montrent que les bactériocines de la sous-classe IIa semblent non structurées en milieu polaire (aqueux) et se structurent seulement au contact d'environnement mimant les membranes : trifluoroéthanol, micelles de dipalmitoylcholine ou *sodium dodécylsulfate* (SDS) (Figure 7 ; ENNAHAR *et al.* 2000 ; FIMLAND *et al.* 1996). Elles possèdent deux régions : une région N-terminale et une région C-terminale, de conformations différentes.

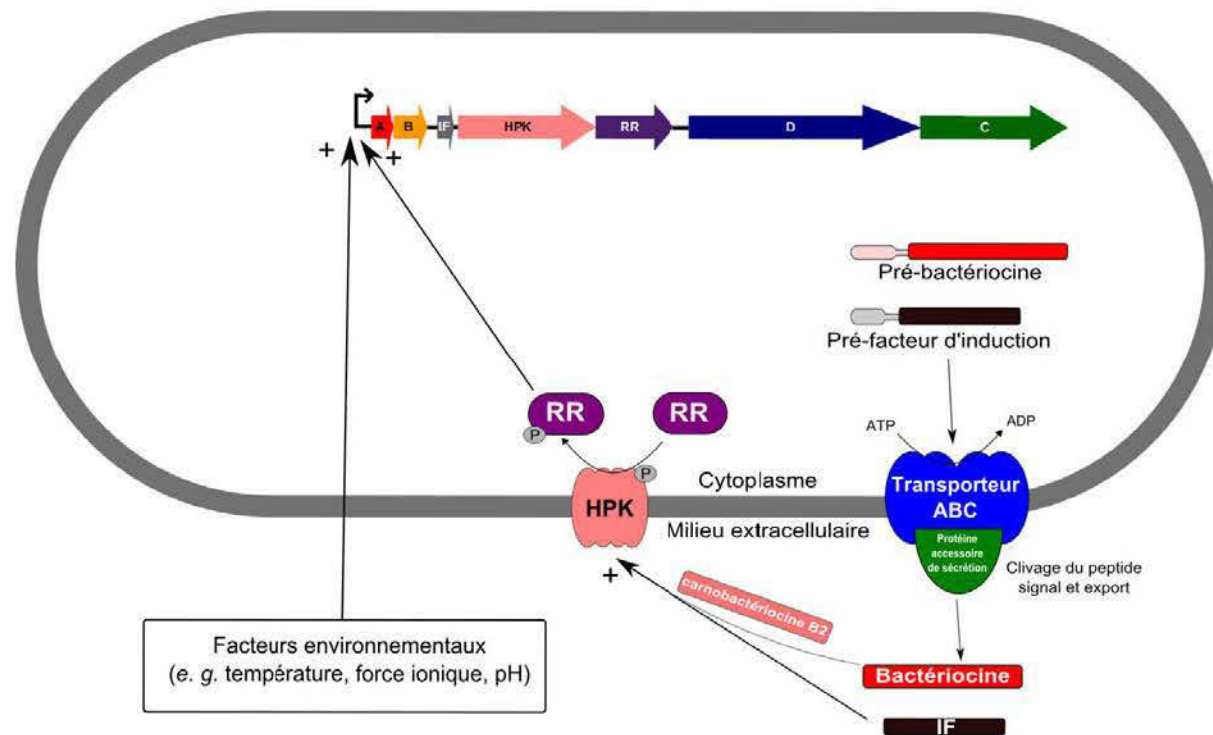


FIGURE 6 – Régulation de la biosynthèse des bactériocines de la sous-classe IIa faisant appel à un système à trois ou deux composants et à la détection du *quorum* adapté de ENNAHAR *et al.* 2000 et QUADRI 2003. La biosynthèse de certaines bactériocines de la sous-classe IIa est basée sur un système à trois composants qui s'auto-induit. Le facteur d'induction (IF) présent dans le milieu extracellulaire permet d'activer une protéine histidine kinase (IIPK). La IIPK activée est capable de transférer un phosphate à une protéine régulatrice (RR) dont le rôle est d'activer les gènes de biosynthèse des bactériocines. Il a été montré que la régulation de la biosynthèse de la carnobactériocine B2 faisait soit appel à un système de régulation à trois composants impliquant les protéines IF, HPK et RR, soit à un système de transduction du signal à deux composants. Dans le système à deux composants, la carnobactériocine B2 est capable de s'auto-induire. Il a également été supposé que les facteurs environnementaux comme la température, la force ionique ou encore le pH étaient également capables d'induire la biosynthèse des bactériocines de la sous classe IIa.

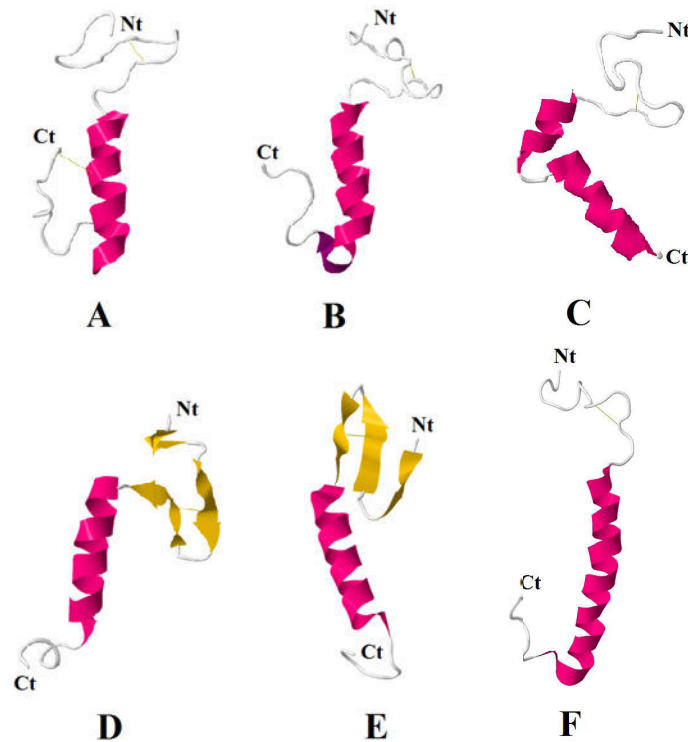


FIGURE 7 – Structure tridimensionnelle des bactériocines de la sous-classe IIa. Les bactériocines de la sous-classe IIa possèdent toutes un pont disulfure dans leur région N-terminale. Les extrémités C-terminale (Ct) et N-terminale sont indiquées (Nt). Les structures ont été déterminées par spectrométrie RMN dans un solvant dodecylphosphocholine (DPC) (A, B, C et D) ou dans un solvant 2,2,2-trifluoroéthanol (TFE) (E et F). (A) structure d’une sakacine P pour laquelle un pont disulfure a été ajouté dans la région C-terminale pour mimer la structure de bactériocines du sous-groupe 1 de la sous-classe IIa ayant deux ponts disulfures et (B) Structure de la sakacine P sauvage. En présence de DPC, la région N-terminale de ces deux sakacines forme une structure en S qui semble être une réminiscence des trois feuillets β antiparallèles. La partie C-terminale de ces deux sakacines forme une hélice α et une extrémité non structurée qui se rabat sur l’hélice α pour former une structure en épingle à cheveux. Cette structure en épingle à cheveux est stabilisée par le pont disulfure en région C-terminale (A), ou par deux tryptophanes (B). (C) Structure de la curvacine A. En présence de DPC, la région N-terminale de la curvacine A forme une structure en S qui semble indiquer la présence d’une structure en feuillets β antiparallèles. La partie C-terminale de la curvacine A est formée par deux hélices α séparées par une région charnière. (D et E) Structure de la leucocine A. En présence de TFE ou de DPC, la région N-terminale de la leucocine A se structure en trois feuillets β antiparallèles et la région C-terminale en hélice α . La structure tridimensionnelle de la leucocine A apparaît mieux définie en présence de TFE qu’en présence de DPC. (F) Structure de la carnobactériocine B2. La carnobactériocine B2 est composée d’une hélice α centrale et d’une région N-terminale déstructurée en présence de TFE (FREGEAU GALLAGHER *et al.* 1997; HAUGEN *et al.* 2005; UTENG *et al.* 2003; WANG *et al.* 1999).

a) La région N-terminale

La région N-terminale contient les 18-20 premiers acides aminés et s'arrête juste avant un tryptophane qui est conservé dans la majorité des bactériocines de la sous-classe IIa. Pour toutes les bactériocines de la sous-classe IIa, une séquence *consensus* YGNGV est présente. La résolution des structures tridimensionnelles de certaines bactériocines (leucocine A, sakacine P et curvacine A) suggère que la région N-terminale des bactériocines des sous-groupes 1, 2 et 3 forme trois feuillets β antiparallèles (FREGEAU GALLAGHER *et al.* 1997; HAUGEN *et al.* 2005; UTENG *et al.* 2003). La résolution de la structure tridimensionnelle de la carnobactériocine B2, une bactériocine du sous-groupe 4, semble indiquer que sa région N-terminale est non structurée. La région N-terminale de la leucocine A (sous-groupe 2) est composée d'acides aminés hydrophobes (Y2, H8, T10 et A24) ; chez la carnobactériocine B2, ces acides aminés sont remplacés par des acides aminés hydrophiles ou neutres (N2, S8, S10 et E24). La différence de composition en acides aminés entre ces régions N-terminales peut expliquer en partie les différences de structure observées (WANG *et al.* 1999).

Le mécanisme par lequel la région N-terminale des bactériocines de la sous-classe IIa interagit avec la membrane a été étudié pour la sakacine P. En mesurant l'intensité de fluorescence des tryptophanes de la sakacin P, il a été montré que la région N-terminale interagit avec les phospholipides anioniques d'un liposome. Cette interaction permet ensuite aux autres résidus de pénétrer dans la membrane lipidique. En mutant certains résidus de la sakacine P, il a été démontré que le résidu V7 est inséré dans le cœur hydrophobe de la membrane et que cet acide aminé favorise la pénétration des autres acides aminés dans la membrane (FIMLAND *et al.* 2006).

Les charges positives de cette région semblent importantes pour l'activité de la mésentéroïne Y105 et de la sakacine P car, L'introduction de charges négatives dans cette région conduit à une diminution de l'activité de la mésentéroïne Y105 (MORISSET *et al.* 2004). Chez la sakacine P, des expériences de mutagenèses aléatoires démontrent que la charge positive la plus importante semble être située entre les positions 11 et 18, les charges en position 8, 1 et 43 semblant être de moindre importance (KAZAZIC *et al.* 2002). Un résultat similaire a été obtenu avec la mésentéroïne Y105 à la position 8 où une charge négative est tolérée (MORISSET *et al.* 2004).

Les feuillets β . Il a été suggéré que la fonction des feuillets β était de permettre d'exposer favorablement le motif YGNGV pour interagir avec un récepteur membranaire (FLEURY *et al.* 1996 ; FREGEAU GALLAGHER *et al.* 1997). Dans le cadre de cette hypothèse, le motif YGNGV interviendrait dans la première étape de fixation de la bactériocine

à la membrane en stabilisant la structure en feuillet β (CHEN *et al.* 1997a,b; FIMLAND *et al.* 1996). La structure en feuillet β permettrait alors la formation d'un bloc de résidus chargés positivement, ce qui faciliterait la pénétration dans la membrane (CHEN *et al.* 1997a,b).

La séquence YGNGV fait partie d'un feuillet β et semble jouait un rôle dans l'activité anti-*Listeria* des bactériocines de cette classe (CHEN *et al.* 1997a; NISSEN-MEYER *et al.* 2009). Par exemple, le remplacement de ce feuillet β par un coude β chez la leucocine A a un effet négatif sur l'activité (BODAPATI *et al.* 2013). Cependant, d'autres bactériocines ayant une altération dans ce motif n'ont pas de perte d'activité vis-à-vis des bactéries du genre *Listeria* (KANATANI *et al.* 1995; SUZUKI *et al.* 2005).

b) La région C-terminale

La région C-terminale s'étend du tryptophane conservé en position 18-20 au dernier acide aminé de la bactériocine. Dans les sous-groupes 1, 2 et 4 cette région présente une hélice α amphiphile alors que celle du sous-groupe 3 en présente deux (Figures 8 et 9; HAUGEN *et al.* 2008). Cette région se termine par une extrémité flexible qui forme une structure en épingle à cheveux en se rabattant sur l'hélice α (UTENG *et al.* 2003). Certaines bactériocines du sous-groupe 1 possèdent en position 13 un aspartate conservée dont le rôle serait d'assurer la flexibilité de la bactériocine (DRIDER *et al.* 2006; JACK *et al.* 1995; NISSEN-MEYER *et al.* 2009).

La fonction de la région C-terminale de la pédiocine PA-1 (du sous-groupe 1) a été étudiée en échangeant les régions C-terminales des bactériocines pédiocine PA-1, sakacine P (sous-groupe 1), leucocine A (sous-groupe 2), et curvacine A (sous-groupe 3). Les résultats de cette étude ont montré que lorsque la région C-terminale de la sakacine P est fusionnée à la région N-terminale de la pédiocine PA-1, une bactériocine ayant le spectre d'action de la sakacine P est obtenue. Des résultats similaires ont été obtenus en réalisant d'autres réarrangements entre les régions C-terminale et N-terminale. Il en a été déduit que la région C-terminale détermine le spectre d'action des bactériocines de la sous-classe IIa (FIMLAND *et al.* 1996).

Une autre étude sur la région C-terminale des bactériocines du sous-groupe 1 a montré qu'un peptide de 15 résidus correspondant à la région C-terminale de la pédiocine PA-1 est capable de diminuer l'activité de la pédiocine PA-1 et de l'entéroccine A. Ce phénomène est probablement dû à une compétition entre le peptide de 15 résidus et les deux bactériocines. La région C-terminale pourrait donc être impliquée dans la fixation des bactériocines de la sous-classe IIa à une cible moléculaire sur la membrane de la bactérie (FIMLAND *et al.*

1998).

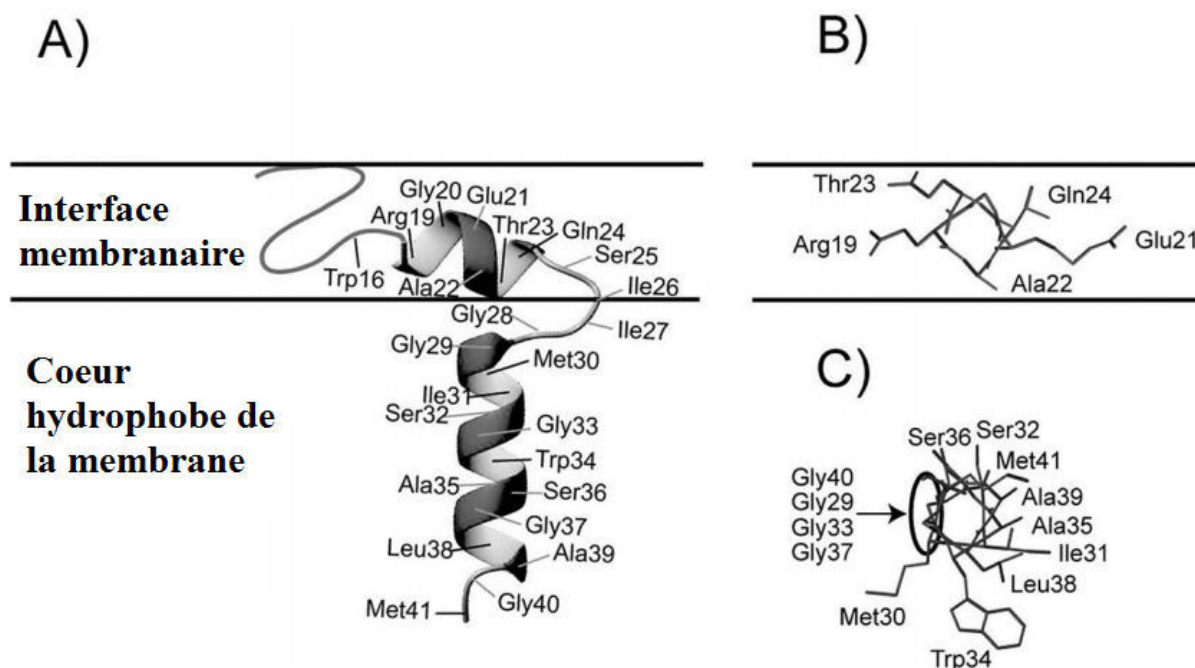


FIGURE 8 – Insertion des bactériocines de la sous-classe IIa dans la membrane bactérienne (sous-groupe 3) d’après HAUGEN *et al.* 2008. Insertion de la curvacine A dans la membrane bactérienne (A). Le domaine N-terminal et l’hélice centrale sont insérés à l’interface de la membrane. La région charnière ainsi que la deuxième hélice sont insérées dans le cœur hydrophobe de la membrane. Le résidu G28 permet à la deuxième hélice de s’insérer dans le cœur hydrophobe de la membrane. (B) Position de l’hélice centrale à l’interface membranaire. Le résidu A22 de l’hélice centrale est positionné près du cœur hydrophobe de la membrane. La région C-terminale est composée d’une deuxième hélice composée d’un motif GxxxGxxxGxxG ("GxxxG-like") formé par les G29, G33, G37 et G40. Il est probable que ces glycines forment un domaine de liaison avec un récepteur membranaire sur la membrane de la bactérie cible.

Hélice α . Le principal rôle de l’hélice α serait de permettre l’insertion dans la membrane. L’orientation oblique de l’hélice α dans l’interface hydrophobe/hydrophile de la membrane faciliterait sa pénétration (BENNIK *et al.* 1998). Une analyse de mutagenèse des acides aminés de l’hélice α de la pédiocine PA-1 a montré l’importance des résidus K20, A21, T23, N27 et A34 dans l’activité de la pédiocine PA-1. Il semble que ces acides aminés soient impliqués dans la liaison à un récepteur membranaire sur la bactérie cible (HAUGEN *et al.* 2011).

Les acides aminés aromatiques de la région C-terminale. Dans la majorité des bactériocines de la sous-classe IIa, un tryptophane est présent au début de la région C-terminale (*i. e.* au début de l'hélice α). Un autre tryptophane est présent en fin ou au milieu de l'hélice α . Il semble que lorsque ce tryptophane est absent, celui-ci soit remplacé par une phénylalanine (FIMLAND *et al.* 2002b; FLEURY *et al.* 1996; MILLER *et al.* 1998a). La substitution de ces résidus provoque une perte d'activité significative (FLEURY *et al.* 1996; MILLER *et al.* 1998a). En outre, La substitution ayant le moins d'impact sur l'activité est celle effectuée avec une phénylalanine, indiquant la nécessité d'un acide aminé aromatique à cette position (FIMLAND *et al.* 2002b).

Ces résidus aromatiques pénètrent dans la membrane lipidique durant l'étape d'ancrage (BHUGALOO-VIAL *et al.* 1999; CASTANO *et al.* 2005). Il a été proposé que le rôle de ces deux tryptophanes serait de perturber la membrane et ainsi de permettre l'insertion de l'hélice α . Ils semblent également stabiliser l'insertion de la bactériocine dans la membrane en stabilisant une structure en épingle à cheveux (Figure 9; MORISSET *et al.* 2004; NISSEN-MEYER *et al.* 2009).

c) Les ponts disulfures

Pont disulfure de la région N-terminale. Dans la région N-terminale des bactériocines de la classe IIa, il existe un pont disulfure conservé. Chez la pédiocine PA-1, ce pont est formé par les cystéines C9 et C14 et semble indispensable au maintien d'une activité antibactérienne. Il permet probablement de stabiliser la structure en épingle à cheveux β de la région N-terminale (MILLER *et al.* 1998a). Dans le cas de la mésenterocine Y105, un résultat a démontré l'importance de la présence de ce ponts (FLEURY *et al.* 1996). Ce résultat entre en contradiction avec un autre où l'activité de cette bactériocine reste quasi intacte après réduction (SIMON *et al.* 2002). Pour d'autres bactériocines de la classe IIa, comme la sakacine P, la curvacine A (EIJSSINK *et al.* 1998), la sakacine A (HOLCK *et al.* 1992) et la carnobacteriocine B2 (QUADRI *et al.* 1994), la réduction du pont disulfure semble n'avoir qu'un effet modéré sur l'activité. Il a aussi été montré que la réduction et l'alkylation des cystéines de la leucocine A n'entraînait pas d'inactivation de la bactériocine (HASTINGS *et al.* 1991).

Pont disulfure de la région C-terminale. Certaines bactériocines de la classe IIa (*e. g.* la pédiocine PA-1, la divergicine M35, la divercine V41, l'entéroccine A, la sakacine G, la coaguline A et la plantaricine 423) possèdent un pont disulfure additionnel dans la région C-terminale. Pour étudier l'impact de cette structure chez la divercine V41, un

traitement à l'aminopeptidase a été utilisé pour séparer le domaine N-terminal du domaine C-terminal. A lui seul, le domaine C-terminal possède une activité antimicrobienne. Après la réduction du pont disulfure, ce domaine devient inactif. Donc, la conformation imposée par ce pont est cruciale pour l'activité (BHUGALOO-VIAL *et al.* 1999).

Afin d'étudier le rôle de ce pont plus en détail, un second pont disulfure a été ajouté à la sakacine P et le second pont de la pédiocine PA-1 a été supprimé. L'introduction de ce second pont chez la sakacine P a permis d'augmenter le spectre et l'activité de la sakacine P, alors que l'effet inverse a été observé sur la pédiocine PA-1 (FIMLAND *et al.* 2000). En outre, la substitution du dernier tryptophane de cette sakacine P par une leucine ou une asparagine a un effet presque nul sur l'activité. il en a donc été déduit, que tout comme les tryptophanes encadrant l'hélice α , le second pont disulfure stabilise l'insertion de la bactériocine dans la membrane en stabilisant la structure en épingle à cheveux (Figure 9; FIMLAND *et al.* 2002b; KAUR *et al.* 2004; NISSEN-MEYER *et al.* 2009).

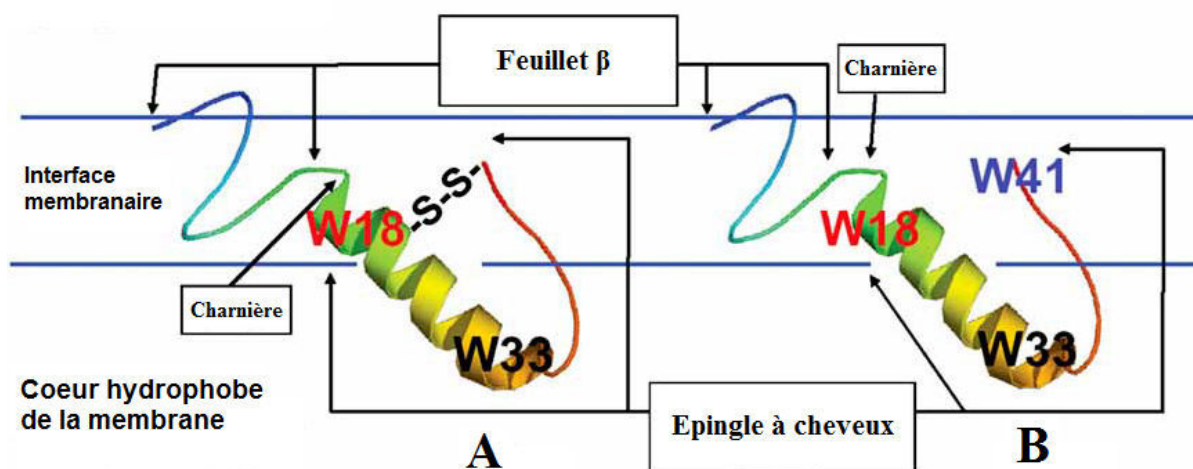


FIGURE 9 – Modèle d'insertion des bactériocines de la sous-classe IIa (sous-groupe 1 et 2) dans une membrane bactérienne d'après NISSEN-MEYER *et al.* 2009. La structure en épingle à cheveux de la région C-terminale est stabilisée par un pont disulfure (A) (entéroline A, divercine V41, divergicine M35, coaguline A, pédiocine PA-1, sakacine G, et plantaricine 423) ou par un tryptophane localisé à l'extrémité C-terminale de la bactériocine.

I.2.5 Mécanisme d'action des bactériocines de la sous-classe IIa

a) Adsorption *via* un récepteur membranaire

L'étape initiale de l'adsorption sur la membrane semble se faire *via* un récepteur membranaire présent à la surface de la membrane de la bactérie cible (CHEN *et al.* 1997a,b; FIMLAND *et al.* 1998). Il a été montré qu'il existe une corrélation entre la sensibilité à la mésentéroïne Y105 et le niveau d'expression de l'opéron *mpt* codant la mannose perméase chez *Enterococcus faecalis* et *L. monocytogenes* (DALET *et al.* 2001; HÉCHARD *et al.* 2001). Partant de cette expérience, les gènes *mptACD* codant la mannose perméase ont été exprimés chez *L. lactis*. L'expression des gènes de la mannose perméase chez *L. lactis* rend cette bactérie sensible aux bactériocines de la classe IIa (RAMNATH *et al.* 2004). De plus, la délétion d'un gène codant pour un activateur de l'expression de la mannose perméase, permet une augmentation de la résistance de *L. monocytogenes* vis-à-vis de la pédiocine PA-1 (VU-KHAC et MILLER 2009). Une banque de mutants de *Listeria innocua* a permis de confirmer un lien entre l'absence d'expression de l'opéron *mpt* et une résistance à la pédiocine PA-1 (XUE *et al.* 2005). La seule expression du gène *mptC* étant suffisante pour rendre *L. lactis* sensible, il semble que cette sous-unité soit le récepteur des classes IIa. L'interaction se fait via une boucle extracellulaire de la protéine MptC (DIEP *et al.* 2007; KJOS *et al.* 2010; RAMNATH *et al.* 2004). Cette sous-unité en combinaison avec la sous-unité MptD formerait le récepteur des bactériocines de la sous-classe IIa. Néanmoins, le rôle de cette dernière est encore incertain. Elle pourrait être impliquée dans une interaction non spécifique avec la bactériocine durant la formation du pore ou aiderait la sous-unité MptC à acquérir sa conformation dans la membrane (DALET *et al.* 2001; DIEP *et al.* 2007; KJOS *et al.* 2011). Bien que de nombreuses bactéries présentes des mannoses perméases, les bactériocines ont généralement un spectre d'action plutôt étroit, souvent composé de bactéries phylogénétiquement proches de la souche productrice. Une étude a montré que ces perméases pouvaient être réparties en trois clusters dont un seul peut servir de récepteur aux bactériocines (KJOS *et al.* 2009).

Sur trente souches mutantes de *L. monocytogenes* résistantes à la sakacine P, il a été montré que le niveau d'expression de la mannose perméase pouvait être soit augmenté, soit diminué (TESSEMA *et al.* 2009). Cette étude suggère que malgré la corrélation précédemment établie entre le taux d'expression de la mannose perméase et la sensibilité aux bactériocines de la sous-classe IIa, d'autres facteurs sont impliqués dans la sensibilité à ces dernières. Certaines études sur des liposomes suggèrent que la présence d'un récepteur n'est ni nécessaire ni la seule explication quant à la sensibilité aux bactériocines de classe

IIa. Ainsi, l'interaction entre la pédiocine PA-1 et la membrane lipidique semble reposée sur des phénomènes électrostatiques (CHEN *et al.* 1998 ; CHEN *et al.* 1997a). En outre, des analyses sur la membrane de bactéries *L. monocytogenes* résistantes aux bactériocines de la sous-classe IIa ont révélé cette résistance 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). Ces expériences suggèrent que la composition de la membrane joue un rôle dans la reconnaissance de la bactérie cible par la bactériocine.

b) Modèles de mécanismes d'action membranaire

Une fois sur la membrane, il existe trois modèles qui ont été établis pour expliquer l'action des peptides antimicrobiens cationiques : le modèle en douve de tonneau, le modèle en pore toroïdal et le modèle en tapis (Figure 10).

Dans le modèle en douve de tonneau, les peptides interagissent entre eux pour former une structure spécifique qui est semblable à la structure d'un canal ionique (WIMLEY 2010). Dans le modèle en pore toroïdal, il n'y a pas d'interaction spécifique entre les peptides antimicrobiens ; les peptides agissent sur la courbure de la membrane de façon coopérative pour former un pore toroïdal (WIMLEY 2010). Dans le modèle en tapis, les peptides s'accumulent à la surface de la membrane par interaction avec les têtes polaires des phospholipides ; les peptides peuvent pénétrer dans la bicouche lipidique à haute concentration (BROGDEN 2005).

c) Actions des bactériocines sur la physiologie de la bactérie cible

L'interaction entre les bactériocines et la bactérie cible génère de multiples effets, complexifiés par le fait que la réponse de la bactérie à la présence de bactériocines est différente selon l'état physiologique de la souche cible (JACQUET *et al.* 2012). Au niveau de la membrane plasmique, la bactériocine BLS P34 induit une modification de la répartition en acides gras et phospholipides (MOTTA *et al.* 2008), et la mésentérocine Y105 entraîne une modification de la fluidité membranaire de *Listeria monocytogenes* (JASNIEWSKI *et al.* 2008a,b). L'étude de l'action de la pédiocine PA-1 sur des liposomes a démontré que les bactériocines pouvaient induire des fuites de composés intracellulaires comme des fuites de potassium et d'acides aminés (CHIKINDAS *et al.* 1993). Ces fuites ont été mises en évidence pour d'autres bactériocines de la sous-classe IIa : bavaricine MN (KAISER et MONTVILLE 1996), l'entérocine P (HERRANZ *et al.* 2001), la mésentérocine Y105 (JASNIEWSKI *et al.*

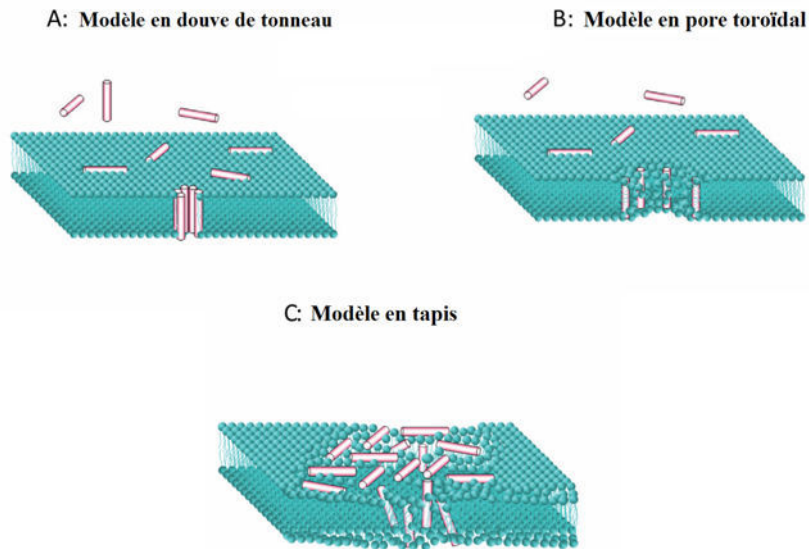


FIGURE 10 – Modèles d’insertion des peptides antimicrobiens dans une bicouche lipidique adaptée de WIMLEY 2010 et BROGDEN 2005. (A) Dans le modèle en douve de tonneau, les peptides antimicrobiens adsorbés à la surface de la bicouche lipidique s’agrègent et s’insèrent pour former un pore. (B) Dans le modèle en pore toroïdal, les peptides antimicrobiens attachés à la surface de la bicouche s’agrègent et entraînent la formation d’une courbure de la bicouche lipidique de façon à former un pore. (C) Dans le modèle en tapis, les peptides antimicrobiens perturbent la bicouche lipidique en s’accumulant parallèlement à la surface de la bicouche.

2008a,b; MAFTAH *et al.* 1993), la mundticine (BENNIK *et al.* 1998), la piscicocine CS526 (SUZUKI *et al.* 2005).

L’altération de la fonction de la membrane plasmique est induite par les fuites de composés et par l’interaction de la bactériocine avec cette dernière. Ceci a permis de démontrer que les bactériocines de la sous-classe IIa pouvaient conduire à la perturbation de la force protomotrice de la membrane. Cette force résulte de deux gradients situés de part et d’autre de la membrane plasmique : le gradient d’ions H^+ (ΔpH) et le gradient d’ions K^+ et Na^+ ($\Delta \Psi$). La pédiocine PA-1, la bavaricine MN, et la divercine V41 perturbent ces deux gradients (BHUGALOO-VIAL *et al.* 1999 ; CHIKINDAS *et al.* 1993 ; CHRISTENSEN et HUTKINS 1992 ; KAISER et MONTVILLE 1996) alors que la mésentéroïcine Y105 et la mundticine ne perturbent que le gradient $\Delta \Psi$ (BENNIK *et al.* 1998 ; JASNIEWSKI *et al.* 2008a,b ; MAFTAH *et al.* 1993). De plus, La perturbation du ($\Delta \Psi$) d’*Enterococcus faecium* par l’entéroïcine P est dépendante de l’état énergétique de la bactérie (HERRANZ *et al.* 2001).

I.2.6 Protéines d'immunité des bactériocines de la sous-classe IIa

Les bactéries qui produisent des bactériocines de la sous-classe IIa produisent en parallèle une protéine d'immunité cytoplasmique qui les protège contre l'action de leur bactériocine (FIMLAND *et al.* 2005). Les protéines d'immunité peuvent être spécifiques d'une bactériocine ou spécifiques de bactériocines proches phylogénétiquement (FIMLAND *et al.* 2002a ; JOHNSEN *et al.* 2004). En outre, comme la partie C-terminale de la bactériocine semblerait responsable de son spectre d'action, il a été suggéré que cette région était responsable de la spécificité de la protéine d'immunité *via* une interaction encore inconnue (FIMLAND *et al.* 2002a ; SPRULES *et al.* 2004).

Actuellement, aucune preuve expérimentale n'a montré une interaction physique directe entre la bactériocine et la protéine d'immunité. Par ailleurs, comme la cette protéine est intracellulaire, il est probable que la protéine d'immunité octroie une immunité vis-à-vis de la bactériocine sans interaction direct. En accord avec cette hypothèse, il a été montré que la protéine d'immunité de la lactococcine A interagissait avec la mannose perméase seulement si la lactococcine A est lié à cette dernière. Cette interaction permet alors d'inhiber les fuites de composé intracellulaire (DIEP *et al.* 2007).

Les résultats ont aussi démontré que la protéine d'immunité de la lactococcine A ne se lie à la mannose perméase que si la lactococcine A est liée à la mannose perméase et que cette interaction permet d'inhiber les fuites de composé intracellulaire (DIEP *et al.* 2007).

I.3 Expression hétérologue de bactériocines recombinantes de la sous-classe IIa

Afin de caractériser les bactériocines et permettre leur utilisation industrielle, des procédés efficaces sont nécessaires pour les produire et les purifier en grande quantité (BIET *et al.* 1998). Il existe deux problèmes empêchant l'obtention de grandes quantités de bactériocines pures : d'une part, les producteurs naturels produisent généralement peu de bactériocines (JASNIEWSKI *et al.* 2008c), d'autre part la purification est souvent difficile du fait de cette faible productivité et nécessite jusqu'à 3 voire 4 étapes de séparation (JASNIEWSKI *et al.* 2008c). Une manière efficace d'augmenter les rendements de production est l'expression hétérologue.

En outre, l'expression hétérologue est une méthode efficace pour produire des protéines ou des peptides modifiés par ingénierie. Par exemple, un système d'expression hétérologue a déjà été utilisé pour produire une bactériocine ciblant à la fois des bactéries gram

positives et négatives (ACUÑA *et al.* 2012). L'un de ces systèmes a également été utilisé pour exprimer une entérotoxine P fusionnée à une étiquette histidine en C-terminal afin de faciliter les étapes de purification (HERRANZ et DRIESSEN 2005).

I.3.1 Expression hétérologue

Pour exprimer une protéine chez une bactérie, la première étape consiste à transformer cette bactérie avec le gène codant la protéine d'intérêt. Ce gène peut être cloné dans la bactérie hôte *via* un plasmide réplcatif ou *via* une intégration chromosomique (THIRY et CINGOLANI 2002). L'expression hétérologue de protéines recombinantes *via* des plasmides est parfois instable. Cette stabilité dans la bactérie hôte est influencée par la taille du plasmide (plus le plasmide est grand plus il est instable), par le mode de réplcation du plasmide, le nombre de copies du plasmide (un plasmide à faible nombre de copies est plus instable qu'un plasmide à haut nombre de copies), la bactérie hôte elle-même (l'utilisation des biais de codon est alors un moyen efficace pour augmenter le niveau d'expression ainsi que la stabilité du plasmide codant la protéine recombinante), ou par les conditions de culture (température, taux de croissance, composition du milieu). De plus, la stabilité du plasmide diminue après la phase de croissance exponentielle ainsi que pendant la durée de l'expression du gène codant la protéine recombinante (SCHMIDT 2005; THIRY et CINGOLANI 2002). L'intégration chromosomique est l'un des moyens utilisés pour augmenter la stabilité du gène codant la protéine recombinante, cependant elle peut diminuer le niveau d'expression d'un gène.

Pour améliorer le procédé de production d'une protéine recombinante, il est nécessaire d'avoir des connaissances aussi bien sur l'hôte que sur la protéine recombinante. La production de la protéine recombinante peut être améliorée en jouant sur plusieurs facteurs comme la production de la biomasse (RIESENBERG et GUTHKE 1999), les conditions de culture (*e. g.* composition du milieu de culture, température, le taux de croissance, l'agitation, l'aération du milieu) (THIRY et CINGOLANI 2002), ainsi que le niveau d'expression du gène codant la protéine recombinante, la stabilité de l'acide ribonucléique messager (ARNm) (JIMÉNEZ *et al.* 2013). L'utilisation d'un promoteur inductible est souvent plus efficace qu'un promoteur constitutif pour améliorer un procédé de production d'une protéine recombinante car il permet de découpler la phase de croissance de la phase de production. La production peut alors être réalisée à une biomasse plus élevée.

De nombreux micro-organismes ont été utilisés comme hôtes pour la production hétérologue de bactériocines. Les trois principaux sont : *E. coli*, *L. lactis* et *Pichia pastoris*.

I.3.2 Expression hétérologue de bactériocines recombinantes de la sous-classe IIa chez *Escherichia coli*

a) Stratégie générale de production de protéines recombinantes chez *E. coli*

Escherichia coli est la bactérie la plus utilisée pour produire des protéines recombinantes, car c'est la bactérie la mieux caractérisée, pour laquelle il existe de nombreux outils de biologie moléculaire. Le principal inconvénient de cette bactérie est qu'elle produit des lipopolysaccharides (LPS). Les LPS sont des endotoxines qui provoquent de la fièvre chez les mammifères. Pour une utilisation commerciale, il faut donc que les étapes de purification permettent la séparation de la protéine d'intérêt et des LPS.

L'expression de protéines recombinantes chez *E. coli* se fait généralement de façon intracellulaire dans le cytoplasme ou dans le périplasme (TERPE 2006). L'inconvénient majeur d'une surexpression dans le cytoplasme est la formation de corps d'inclusion (MAKRIDES 1996) et l'inconvénient d'une production dans le périplasme est la forte concentration en protéase. Afin de permettre la sécrétion de protéines dans le périplasme, il faut ajouter un peptide signal spécifique en N-terminal de la protéine. L'expression dans ce compartiment est notamment utilisée pour la production de protéines ayant des ponts disulfures. C'est dans le périplasme d'*E. coli* que se trouvent les enzymes qui catalysent leur formation (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD ; Figure 11) (SCHMIDT 2004 ; TERPE 2006).

b) Production de bactériocines recombinantes chez *E. coli*

E. coli est un hôte facilement modifiable qui permet de produire un grand nombre de protéines, c'est donc logiquement l'un des premiers hôtes qui a été testé pour produire des bactériocines (RODRÍGUEZ *et al.* 2003). La production de bactériocines chez *E. coli* est généralement intracellulaire et une étape de lyse est alors nécessaire avant la purification de la bactériocine. Chez *E. coli* les bactériocines sont généralement produites avec deux étiquettes : une étiquette d'affinité pour optimiser la purification et une étiquette de solubilisation (Tableau 2) pour limiter la formation de corps d'inclusion (MAKRIDES 1996). La fonction de l'étiquette d'affinité sera détaillée dans la partie purification. Seule la divercine RV41 est active lorsqu'elle est en fusion avec la thiorédoxine ; toutes les autres bactériocines en fusion avec une étiquette de solubilisation sont inactives. Cependant, l'activité est en général restaurée après clivage de la protéine de fusion.

La séquence codant la bactériocine en fusion avec une ou plusieurs étiquettes est généralement placée sous le contrôle du promoteur T7lac, induit par ajout d'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), ou de lactose dans le milieu de culture. Il a été

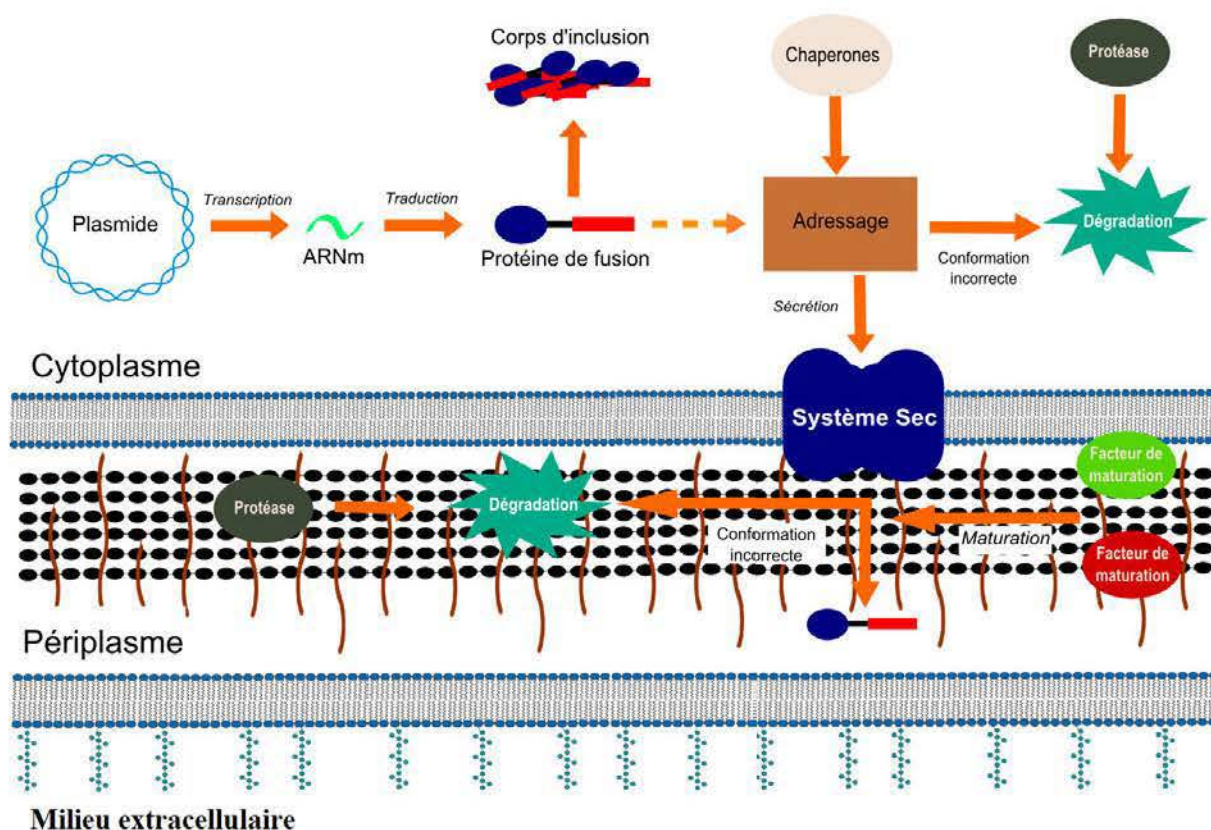


FIGURE 11 – Production hétérologue de bactériocine par *E. coli*. Chez *E. coli*, la bactériocine est généralement produite en fusion avec une étiquette de solubilisation pour limiter la formation de corps d'inclusion. La bactériocine peut aussi être sécrétée dans le périplasma par ajout d'un peptide signal. Avant et après sécrétion dans le périplasma, un contrôle qualité de la protéine recombinante a lieu. Si la conformation de la protéine recombinante est incorrecte, elle est dégradée. La maturation de la protéine recombinante a lieu dans le périplasma *via* des facteurs de maturation (*e. g.* DsbA, DsbC, DsbG, glycosyl transférase)

montré que l'induction avec le lactose permet une augmentation de la productivité des carnobactériocines BM1 et B2 d'un facteur 2 comparé à l'utilisation d'IPTG. Ceci est sûrement dû au fait que l'IPTG est toxique pour *E. coli* (JASNIEWSKI *et al.* 2008c).

La sécrétion de la pécidiocine PA-1 directement dans le milieu de culture d'*E. coli* a également été étudiée. Pour cette étude, une souche mutante dépourvue de membrane externe a été utilisée. Dans ce système, la sécrétion se fait *via* le système Sec d'*E. coli*, ce qui permet la sécrétion de la protéine de fusion dans le périplasma. La sécrétion de la pécidiocine PA-1 dans le périplasma a été obtenue grâce à une fusion entre la pécidiocine et la protéine de liaison au maltose (MBP) qui possède un signal peptide permettant la sécrétion *via* le système Sec (MILLER *et al.* 1998b).

La production et la purification de bactériocines produites chez *E. coli* peuvent impli-

quer une étape de lyse et des étapes de renaturation de la bactériocine. Ces étapes sont complexes et pour cette raison d'autres hôtes ont été envisagés.

Tableau 2 – Étiquettes de solubilisation utilisées pour la production hétérologue de bactériocines de la sous-classe IIa chez *E. coli*.

Bactériocine	Protéine de fusion	Référence
Pédiocine PA-1	Thiorédoxine	BEAULIEU <i>et al.</i> 2007
	Domaine de liaison à la chitine	INGHAM <i>et al.</i> 2005
	Dihydrofolate réductase	MOON <i>et al.</i> 2006
	Glutathion S-transférase	SONG <i>et al.</i> 2013
	Protéine de liaison au maltose	MILLER <i>et al.</i> 1998b
Entérocline P	Thiorédoxine	CUOZZO <i>et al.</i> 2006
	Domaine de liaison à la chitine	INGHAM <i>et al.</i> 2005
Carnobactériocine BM1	Thiorédoxine	JASNIEWSKI <i>et al.</i> 2008c
Carnobactériocine B2	Thiorédoxine	JASNIEWSKI <i>et al.</i> 2008c
	Protéine de liaison au maltose	QUADRI <i>et al.</i> 1997
Divercine RV41	Thiorédoxine	RICHARD <i>et al.</i> 2004 ; RIHAKOVA <i>et al.</i> 2009 ; YILDIRIM <i>et al.</i> 2007
Piscicoline 126	Domaine de liaison à la chitine	INGHAM <i>et al.</i> 2005
Divercine V41	Domaine de liaison à la chitine	INGHAM <i>et al.</i> 2005
BacR1	Domaine de liaison à la chitine	INGHAM <i>et al.</i> 2005
Entérocline A	Domaine de liaison à la cellulose	KLOCKE <i>et al.</i> 2005
Bactériocine E50-52	Protéine SUMO (<i>Small Ubiquitin-like Modifier</i>)	WANG <i>et al.</i> 2013
prés-Carnobactériocine B2	Protéine de liaison au maltose	QUADRI <i>et al.</i> 1997

I.3.3 Expression hétérologue de bactériocines recombinantes de la sous-classe IIa chez les levures

a) Intérêts technologiques des levures

Les levures comme *Saccharomyces cerevisiae* et *Pichia pastoris* font partie des hôtes les plus utilisés pour la production de protéines recombinantes. Les levures ont majoritairement le statut *generally recognized as safe* (GRAS), le procédé de purification est donc moins réglementé. De plus, la génétique des levures est bien connue, ce qui facilite le clonage du gène codant la protéine recombinante (RAI et PADH 2001).

b) Production hétérologue de bactériocines *via* des levures

La levure modèle *Saccharomyces cerevisiae* est la première levure qui ait été utilisée pour produire la pédiocine PA-1. Elle a été choisie car elle est couramment utilisée comme flore protectrice, en combinaison avec des bactéries lactiques, pour entrer en compétition avec la croissance de pathogènes et de bactéries de contamination induisant la décomposition des aliments (SCHOEMAN *et al.* 1999). C'est dans le but d'améliorer ses propriétés de flore protectrice que *S. cerevisiae* a été modifiée pour sécréter la pédiocine PA-1. Les protéines qui sont sécrétées chez les eucaryotes comme la levure sont synthétisées sous la forme d'un pré-pro-peptide (Figure 12). C'est pourquoi, pour permettre la sécrétion de la pédiocine PA-1 dans le milieu de culture, le peptide signal de la pédiocine PA-1 a dû être modifié. La séquence codant le peptide signal du facteur α (MF α 1), composé d'un pro- et d'un pré-peptide, a été fusionnée à l'extrémité 5' de la séquence codant la pédiocine PA-1 mature. Le pre-peptide est excisé dans le réticulum endoplasmique et le pro-peptide dans l'appareil de Golgi. La séquence nucléotidique résultante codant la pré-pro-pédiocine a été ensuite insérée en aval du promoteur de l'alcool déshydrogénase I. Ce système a permis de produire et de sécréter une pédiocine PA-1 active dans le milieu de culture (SCHOEMAN *et al.* 1999). La même stratégie a été utilisée avec succès pour exprimer de façon hétérologue la plantaricine 423 chez *S. cerevisiae* (VAN REENEN *et al.* 2003). Dans les deux cas, il a été montré que les bactériocines plantaricine 423 et pédiocine PA-1 étaient faiblement produites par *S. cerevisiae*. Dans le but d'améliorer la sécrétion de la pédiocine PA-1, celle-ci a été produite chez *P. pastoris* en suivant une stratégie similaire à celle utilisée chez *S. cerevisiae*. La séquence nucléotidique codant la pré-pro-pédiocine PA-1 a été placée sous le contrôle du promoteur de l'alcool oxydase. Un dosage par *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) a permis d'estimer que la levure produisait 74 $\mu\text{g/ml}$ de pédiocine. Malgré le fait que la pédiocine PA-1 soit présente en quantité dans le surna-

geant, elle est toutefois peu active. Des analyses complémentaires ont démontré que des peptides ayant une structure semblable au collagène étaient pour une raison inconnue liés à la région N-terminale de la pédiocine PA-1. Un traitement à la collagénase a permis de restaurer l'activité (BEAULIEU *et al.* 2005). Les bactériocines entéroccine P (GUTIÉRREZ *et al.* 2005b), hiracine JM79 (SÁNCHEZ *et al.* 2008), et sakacine A (JIMÉNEZ *et al.* 2013) ont également été produites chez *P. pastoris*. Comme pour la pédiocine PA-1, les bactériocines hiracine JM79 et sakacine A étaient moins actives lorsqu'elles étaient produites chez *P. pastoris*. Dans le cas de l'hiracine JM79, les analyses de spectrométrie de masse semblent montrer qu'il n'y a pas de modification post-traductionnelle, ce qui semble indiquer que la raison de la perte d'activité n'est pas la même que pour la pédiocine PA-1 (SÁNCHEZ *et al.* 2008).

Dans un souci d'amélioration des performances de production, d'autres levures ont été testées. Ainsi, l'expression hétérologue de l'entéroccine A a été testée chez *P. pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha* et *Arxula adeninivorans*. Pour permettre la sécrétion par ces levures, comme expliqué précédemment, les séquences nucléotidiques codant le MF α 1 a été fusionné à l'extrémité 5' de la séquence nucléotidique codant l'entéroccine A mature. Pour chaque levure, un promoteur différent a été utilisé pour exprimer le gène de la pré-pro-entéroccine A. Les promoteurs inductibles de l'alcool oxydase et le promoteur de la protéine LAC4 ont respectivement été utilisés pour exprimer la pré-pro-entéroccine A chez *P. pastoris* et *K. lactis*. Le promoteur constitutif du facteur d'élongation de traduction EF-1 α a été utilisé pour l'expression hétérologue chez *H. polymorpha* et le promoteur de la nitrite réductase a été utilisé pour l'expression chez *A. adeninivorans*. Toutes ces levures permettent la production et la sécrétion d'une entéroccine A active dans le surnageant de culture et permettent une augmentation de sa productivité par rapport au producteur naturel. Pour *P. pastoris*, la productivité augmente d'un facteur 30 par rapport au producteur naturel; pour *K. lactis*, la productivité augmente d'un facteur 7; et pour *H. polymorpha*, la productivité augmente d'un facteur 3,2 (BORRERO *et al.* 2012). Pour cette bactériocine, aucune perte d'activité par rapport au producteur naturel n'est observée, contrairement à ce qui a été décrit pour la pédiocine PA-1, la sakacine A et l'hiracine JM79. Il semble que la perte d'activité observée chez les levures soit dépendante de la bactériocine et de la souche (BORRERO *et al.* 2012; JIMÉNEZ *et al.* 2013).

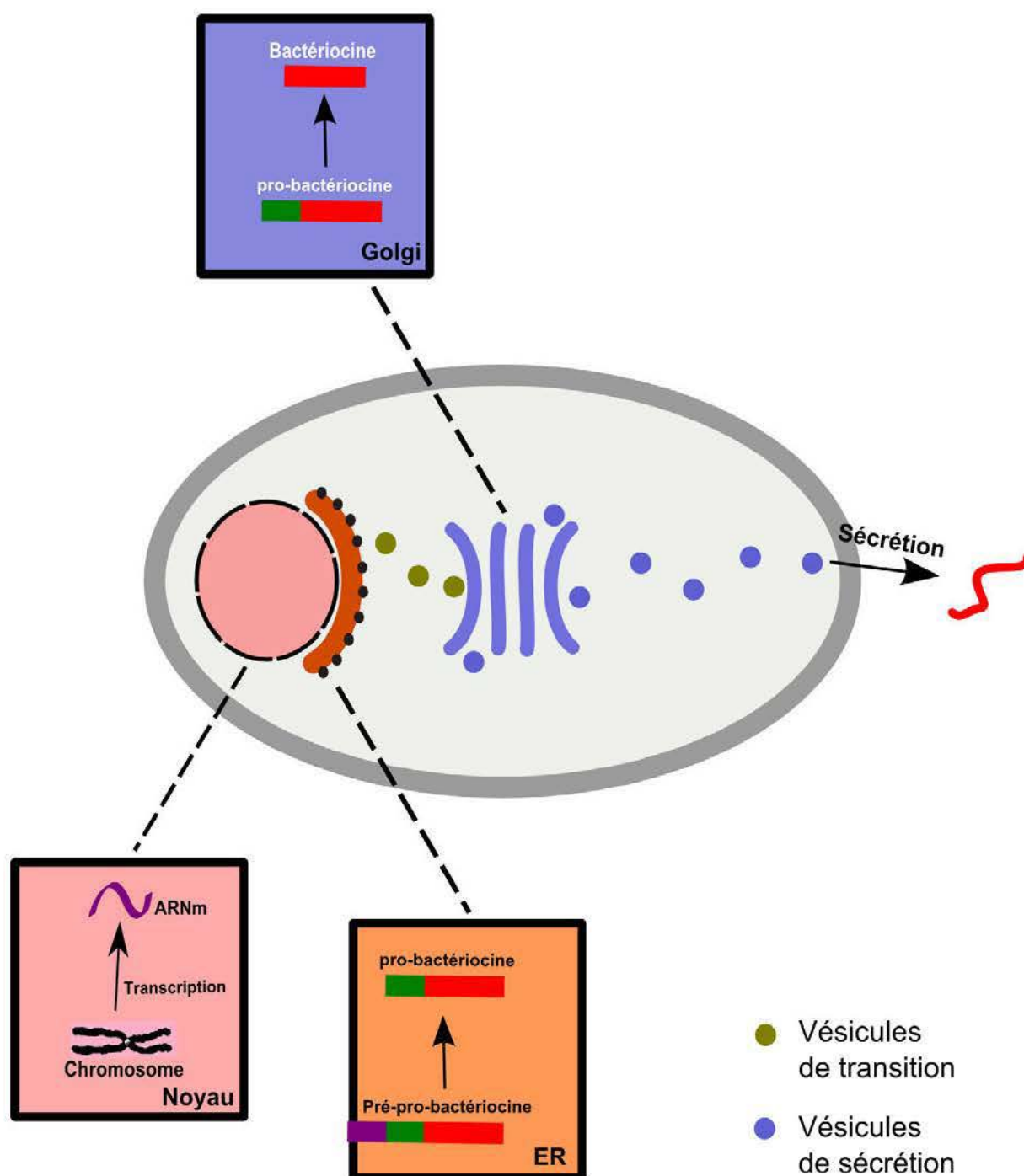


FIGURE 12 – Sécrétion hétérologue des bactériocines chez les levures. Les bactériocines sécrétées chez les levures sont produites sous la forme de pré-pro-bactériocines, lesquelles permettent ainsi d'obtenir des bactériocines recombinantes sécrétées dans le milieu de culture. L'ARNm codant la pré-pro-bactériocine est produit dans le noyau et est traduit au niveau du réticulum endoplasmique (ER). Une fois dans le réticulum endoplasmique, les ponts disulfures sont formés grâce à des protéines disulfides isomérases. Le pré-peptide est clivé et la pro-bactériocine est dirigée vers l'appareil de Golgi via les vésicules de transition. Dans l'appareil de Golgi, le pro-peptide est clivé, la bactériocine est alors dirigée vers les vésicules de sécrétion.

I.3.4 Expression hétérologue de bactériocines recombinantes de la sous-classe IIa chez *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* et *cremoris*

a) Intérêts technologiques de la bactérie *L. lactis*

Des bactéries telle que *L. lactis*, ont été utilisées pour la production hétérologue de bactériocines. Puisque *L. lactis* est une bactérie gram-positive, elle ne présente pas de membrane externe, ce qui facilite la sécrétion dans le milieu de culture des protéines recombinantes et donc théoriquement leur purification. De plus, il n'existe qu'une seule protéine (*unknown secreted protein of 45 kDa*; Usp45) sécrétée par *L. lactis* détectable en SDS-PAGE après révélation du gel au bleu de Coomassie (ASSELDONK *et al.* 1993). C'est pourquoi, il est attendu que peu de protéines interfèrent avec la purification de la protéine recombinante.

Le principal inconvénient de l'utilisation de *L. lactis* comme bactérie-usine est la faible biomasse générée en phase stationnaire, car son métabolisme fermentaire, et donc l'accumulation de lactate dans le milieu de culture, stoppe la croissance bactérienne (RIESENBERG et GUTHKE 1999). Toutefois, les récentes avancées technologiques permettent d'extraire en ligne le lactate du milieu de culture grâce à un système de dialyse, ce qui permet d'atteindre une biomasse de 60 g/L ($OD_{600nm} = 180$) en fin de croissance (JØRGENSEN *et al.* 2014; MIERAU 2007).

b) Stratégie de production hétérologue chez *L. lactis*

L'étude en laboratoire de *L. lactis* et l'intérêt grandissant suscité par cette bactérie pour la production de protéine a permis la mise au point de systèmes d'expression spécifiques. Certains systèmes d'expression sont basés sur des promoteurs constitutifs (P_{21} , P_{23} , P_{32} , P_{44} , P_{59}) ou inductibles (P_{nisA} , P_{170} , $P_{zn}zitR$, P_{lacA} , P_{T7} , P_{xyIT}). L'un des systèmes d'expression le plus utilisé chez *L. lactis* pour produire des protéines recombinantes est le système *nisin controlled gene expression* (NICE). Ce système (Figure 13) est basé sur l'utilisation du promoteur de la nisine A (P_{nisA}) et de la nisine A, laquelle est utilisée comme inducteur du système à faible concentration (de l'ordre du $\mu\text{g/L}$) (MIERAU et KLEEREBEZEM 2005; MIERAU *et al.* 2005; MORELLO *et al.* 2008; PONTES *et al.* 2011).

Chez *L. lactis*, les protéines recombinantes peuvent être soit produites dans le domaine intracellulaire, soit sécrétées dans le milieu extracellulaire, soit ancrées sur la face externe de la membrane plasmique (Figure 14). Les peptides signaux qui permettent la sécrétion *via* le système Sec sont localisés en partie N-terminale des protéines. Il existe aussi des

motifs permettant l'ancrage de la protéine à la paroi cellulaire de la bactérie. Ces signaux d'ancrage se trouvent à l'extrémité C-terminale de la protéine et comportent un motif peptidique LPXTG qui est reconnu par le système responsable de l'ancrage de la protéine. La protéine qui possède ce motif, une fois sécrétée dans le milieu extracellulaire, se retrouve liée de façon covalente *via* le motif LPXTG à un peptidoglycane de la paroi cellulaire (PONTES *et al.* 2011). La production hétérologue de protéines à la surface de cellules de *L. lactis* a permis notamment de tester avec succès la possibilité d'utiliser cette bactérie comme vaccin vivant (PONTES *et al.* 2011).

Dans la majorité des stratégies de production chez *L. lactis*, la protéine recombinante est sécrétée dans le surnageant de culture. Dans le but d'améliorer la sécrétion de ces protéines, de nombreuses études se sont penchées sur les facteurs qui influencent cette dernière (LE LOIR *et al.* 2005). Il a été suggéré que la nature, la taille de la protéine, la nature du peptide signal utilisé pour la sécrétion, et la nature des acides aminés de la protéine recombinante localisés après le site de clivage du peptide signal étaient des facteurs qui limitaient la sécrétion de la protéine recombinante par *L. lactis*.

Une étude a démontré, en utilisant la nucléase B de *Staphylococcus aureus* (NucB), que le remplacement du peptide signal de cette dernière par le peptide signal de la protéine Usp45 (SP_{Usp45}) permettait la sécrétion de la protéine *via* le système Sec de *L. lactis* (Figure 15), et ainsi l'amélioration de sa productivité (LE LOIR *et al.* 2001). D'autres peptides signaux ont été testés et, dans la majorité des cas, ces peptides signaux étaient moins efficaces que SP_{Usp45} (POQUET *et al.* 1998 ; RAVN *et al.* 2000). Cependant, un peptide signal originaire de *Lactobacillus brevis* s'est montré plus efficace que le SP_{Usp45} pour sécréter la protéine FedF chez *L. lactis* (LINDHOLM *et al.* 2004). Ces résultats révèlent qu'une sécrétion optimale chez *L. lactis* résulte d'une interdépendance entre le peptide signal et la protéine recombinante (LE LOIR *et al.* 2005).

Une étude a mis en évidence que lorsque le domaine N-terminal de NucB était tronqué, SP_{Usp45} n'avait alors plus d'effet positif sur la production de la nucléase (LE LOIR *et al.* 2001). C'est pourquoi il en a été déduit que les acides aminés en amont du site de clivage du peptide signal jouent aussi un rôle dans l'efficacité de sécrétion de la protéine recombinante (LE LOIR *et al.* 1998, 2001). Lors de l'insertion du pro-peptide LEISSTCDA entre le peptide signal et la protéine recombinante, la sécrétion de la protéine recombinante est améliorée (LE LOIR *et al.* 1998). Il semble que les charges négatives soient responsables de l'amélioration de la sécrétion des protéines recombinantes (LE LOIR *et al.* 2001). L'hypothèse émise pour expliquer ce phénomène est que la protéine recombinante serait sécrétée plus rapidement par le système Sec et échapperait alors au système protéolytique intracellulaire de *L. lactis* (BERMÚDEZ-HUMARÁN *et al.* 2002 ; LE LOIR *et al.* 2005).

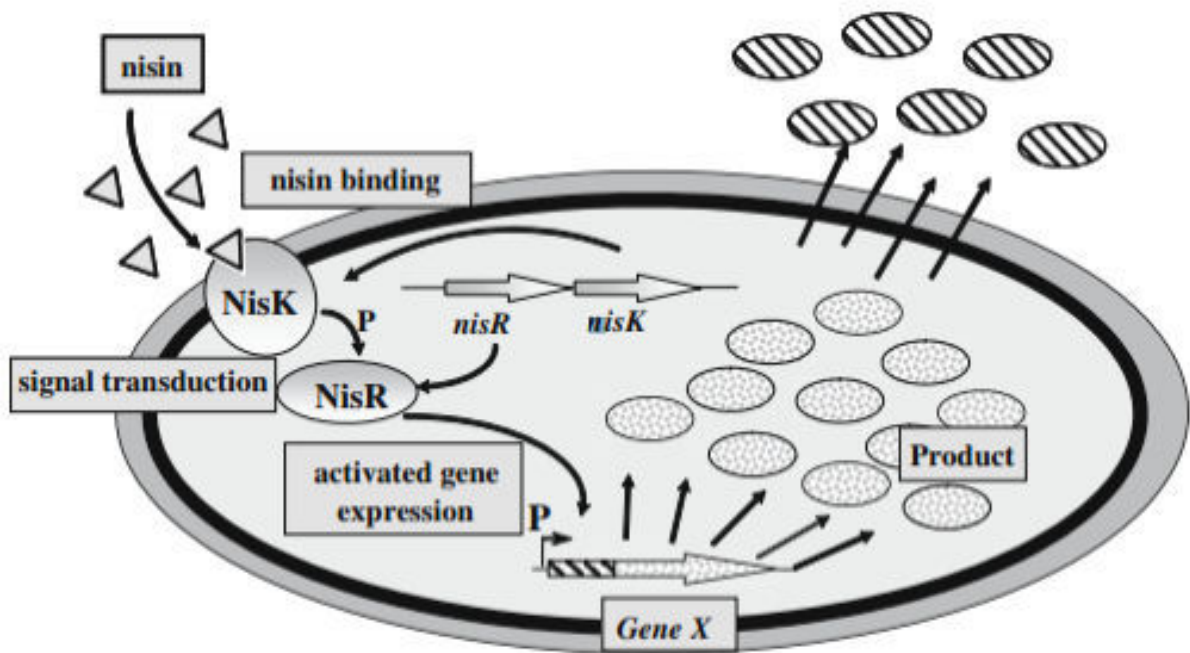


FIGURE 13 – Système NICE chez *Lactococcus lactis* NZ9000 d'après MIERAU et KLEEREBEZEM 2005. Le promoteur P_{nisA} est activé par un système à deux composantes : la protéine membranaire NisK est activée par la présence de nisine dans le milieu extracellulaire. Une fois activée, NisK phosphoryle NisR qui peut alors activer le promoteur P_{nisA} .

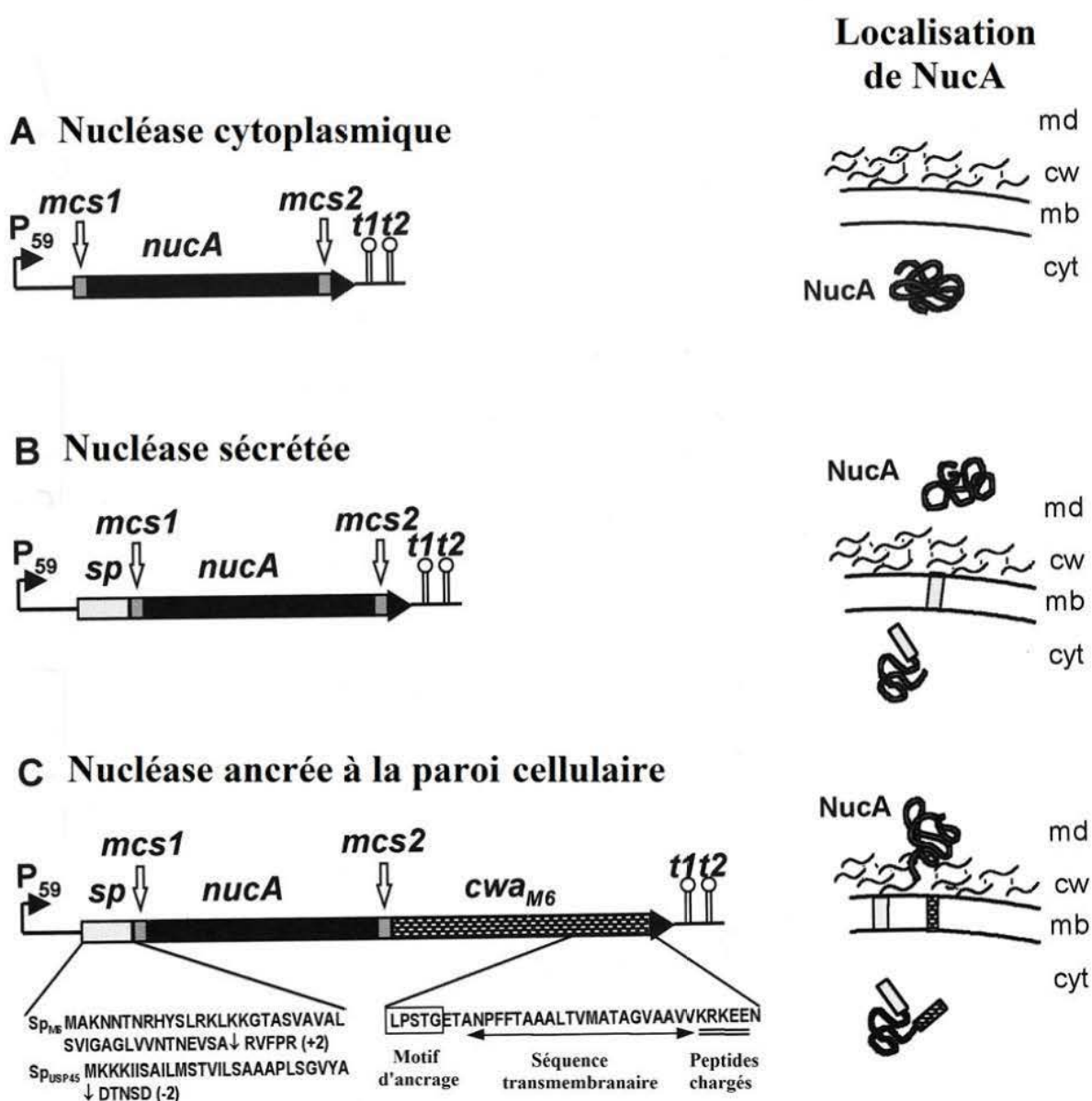


FIGURE 14 – Adressage de la nucléase NucA chez les bactéries lactiques d'après DIEYE *et al.* 2001. P59, promoteur de lactocoques ; *sp*, signal peptide de la pré-protéine M6 (*sp*_{M6}) ou de la pré-protéine Usp45 (*sp*_{Usp45}) ; *nucA*, gène de structure de la nucléase A ; *cwa*_{M6}, séquence du domaine d'ancrage à la paroi cellulaire de la pré-protéine M6 ; *t1t2*, terminateur de la transcription ; *mcs1* et *mcs2*, site de clonage ; cyt, cytoplasme ; mb, membrane ; cw, paroi cellulaire ; md, milieu. La flèche verticale noire dans la séquence peptidique du SP_{M6} et du SP_{Usp45} indique le site de clivage de la peptidase ; les nombres entre parenthèses indiquent la charge globale des 5 acides aminés en aval du site de clivage

c) Production hétérologue de bactériocines de la sous-classe IIa par *L. lactis*

Parce qu'elle est naturellement résistante à la majorité des bactériocines de la sous-classe IIa, *L. lactis* est l'un des hôtes les plus utilisés pour la production hétérologue de ces bactériocines. Pour améliorer la production globale chez *L. lactis*, il est courant de modifier la protéine recombinante pour qu'elle puisse être sécrétée *via* le système Sec dans le milieu de culture (Figure 15). La stratégie utilisée est alors d'ajouter la séquence nucléotidique codant un peptide signal en 5' de la séquence nucléotidique codant la structure mature de la bactériocine recombinante (Tableau 3). Cette modification a deux buts : permettre la sécrétion de la bactériocine dans le milieu de culture et permettre la surexpression de la protéine par *L. lactis*. Le peptide signal le plus utilisé est le peptide SP_{Usp45}.

Deux autres peptides signaux ont été utilisés : le peptide signal de l'entéroline P (SP_{EntP}) et le peptide signal de l'hiracine JM79 (SP_{HirJM79}), tous deux de type Sec. Le peptide SP_{EntP} a été utilisé pour permettre la sécrétion de l'entéroline A (MARTÍN *et al.* 2007b) ainsi que de la pédiocine PA-1 (MARTÍN *et al.* 2007a). Les résultats ont montré que le peptide SP_{EntP} permettait d'améliorer la productivité spécifique (à savoir la quantité de bactériocine produite rapportée à la biomasse) de l'entéroline A et de la pédiocine PA-1 (MARTÍN *et al.* 2007a,b). Les effets des différents peptides signaux SP_{EntP}, SP_{HirJM79}, SP_{Usp45} sur la sécrétion de l'entéroline A et de la sakacine A (BARRERO *et al.* 2011a ; JIMÉNEZ *et al.* 2013) ont été comparés. Les résultats concernant l'entéroline A montrent que les trois peptides signaux (SP_{EntP}, SP_{HirJM79}, SP_{Usp45}) permettent d'augmenter la productivité spécifique par rapport au producteur naturel. La meilleure productivité spécifique est obtenue avec les peptides signaux SP_{HirJM79} et SP_{Usp45}. Il est possible que les peptides signaux SP_{HirJM79} et SP_{Usp45} soient mieux reconnus par les chaperonnes de *L. lactis* ce qui expliquerait qu'ils soient plus efficaces que le peptide SP_{EntP} (BARRERO *et al.* 2011a). Les résultats concernant la sakacine A montrent que la meilleure productivité spécifique est obtenue avec le peptide signal SP_{Usp45}. Avec le peptide signal SP_{HirJM79}, une productivité spécifique similaire à celle du producteur naturel est obtenue. Le peptide signal SP_{EntP} quant à lui ne permet pas la sécrétion de la sakacine A *via L. lactis*. Il a été suggéré dans cette étude que la sakacine A était dégradée avant ou pendant la sécrétion lorsqu'elle était fusionnée avec le SP_{EntP} (JIMÉNEZ *et al.* 2013).

La nature des charges présentes en aval du peptide signal peut poser problème lors de la sécrétion *via* le système Sec (LE LOIR *et al.* 2005). Comme le domaine N-terminal des bactériocines est chargé positivement, il a été suggéré que leur sécrétion *via* le système Sec n'était pas optimale. Il a d'ailleurs été montré que la chimère sakacine A SP_{Usp45} était partiellement dégradée en N-terminal au moment de la sécrétion *via* le système Sec (JIMÉNEZ *et al.* 2013). Pour améliorer l'efficacité de la sécrétion de la sakacine A *via* le

Tableau 3 – Production hétérologue de bactériocines chimériques chez *L. lactis*.

Bactériocine	Peptide signal	Système de sécrétion	Référence
Pédiocine PA-1	SP _{Usp45}	Système Sec	LI <i>et al.</i> 2011
	SP _{EntP}	Système Sec	MARTÍN <i>et al.</i> 2007a
	SP _{LcnA}	Système de sécrétion de la lactococcine A	HORN <i>et al.</i> 1998
Entéroccine A	SP _{Usp45}	Système Sec	BORRERO <i>et al.</i> 2011a
	SP _{EntP}	Système Sec	MARTÍN <i>et al.</i> 2007b
	SP _{HirJM79}	Système Sec	BORRERO <i>et al.</i> 2011a
Hiracine JM79	SP _{Usp45}	Système Sec	BORRERO <i>et al.</i> 2011b
Sakacine A	SP _{Usp45}	Système Sec	JIMÉNEZ <i>et al.</i> 2013
	SP _{EntP}	Système Sec	JIMÉNEZ <i>et al.</i> 2013
	SP _{HirJM79}	Système Sec	JIMÉNEZ <i>et al.</i> 2013
Entéroccine P	SP _{Usp45}	Système Sec	HERRANZ et DRIESSEN 2005
Leucocine C	SP _{Usp45}	Système Sec	WAN <i>et al.</i> 2013
Divercine RV41	SP _{Usp45}	Système Sec	BERMÚDEZ-HUMARÁN <i>et al.</i> 2007

système Sec, la répartition des charges de la partie N-terminale de la sakacine A a été modifiée pour ressembler à celle de la partie N-terminale de l'entéroccine P. L'arginine en position +2 a été déplacée en position +3 par l'insertion d'une thréonine en position +2. Les analyses révèlent que cette nouvelle chimère n'est pas dégradée par le système Sec de *L. lactis* (JIMÉNEZ *et al.* 2013).

Dans la majorité des cas, les stratégies présentées ci-dessus permettent d'améliorer la productivité spécifique des bactériocines par rapport à la productivité spécifique *via* le producteur naturel. Néanmoins, les bactériocines produites sont souvent moins actives que celles produites par le producteur naturel (BERMÚDEZ-HUMARÁN *et al.* 2007; BORRERO *et al.* 2011a,b; JIMÉNEZ *et al.* 2013; MARTÍN *et al.* 2007a,b). Il semble que se soit un

phénomène multifactoriel qui aurait 5 explications :

1. Il est possible que la surexpression induise l'expression de protéases qui vont dégrader les bactériocines recombinantes (DARMON *et al.* 2002).
2. Il a été décrit que les systèmes de sécrétion fonctionnaient avec des protéines de maturation. La perte d'activité peut donc être due à l'absence d'une protéine de maturation (SARVAS *et al.* 2004). L'entéroccine A et la sakacine A possèdent des ponts disulfures qui ont un rôle important dans l'activité (EIJSSINK *et al.* 1998). Il a été montré que la formation des ponts disulfures était catalysée par des enzymes appelées thiol-disulfide oxydoréductase (TDOR) (KOUWEN *et al.* 2007). Il se peut que les TDOR soient absentes chez *L. lactis*, ce qui induirait la perte d'activité (BORRERO *et al.* 2011a ; JIMÉNEZ *et al.* 2013). Il a d'ailleurs été suggéré que l'absence de protéine appartenant à cette famille était problématique pour la production d'une protéine aux propriétés antifongiques possédant un pont disulfure chez *L. lactis* (FREITAS *et al.* 2005).
3. L'oxydation de la méthionine peut conduire à une perte d'activité de la pédiocine PA-1 (JOHNSEN *et al.* 2000). Le même phénomène peut se produire pour l'entéroccine A (BORRERO *et al.* 2011a).
4. Il est possible qu'il y ait une oxydation des résidus cystéines et qu'elle entraîne une perte d'activité (BORRERO *et al.* 2011a).
5. Il se peut aussi qu'un phénomène d'agrégation de la bactériocine soit responsable de la perte d'activité (BORRERO *et al.* 2011a,b ; JIMÉNEZ *et al.* 2013).

Un autre système d'expression hétérologue de la pédiocine PA-1 a été mis au point chez *L. lactis*. Il est basé sur le système de sécrétion de la lactococcine A. Dans ce système, le peptide signal de la lactococcine A (SP_{LcnA}) a été fusionné à la pédiocine PA-1 pour que sa sécrétion se fasse *via* le DTS de la lactococcine A, qui est composé de deux protéines : LcnC et LcnD. Ce système permet de sécréter une pédiocine PA-1 active sans perte d'activité. Dans un premier temps, ce système permettait la sécrétion de seulement 270 ng/mL de pédiocine PA-1. La sécrétion a été améliorée à 1,9 μ g/mL en co-exprimant LcnC, LcnD, et la pédiocine PA-1 sur le même vecteur d'expression (ARQUÉS *et al.* 2008 ; HORN *et al.* 1998, 1999 ; REVIRIEGO *et al.* 2005, 2007a).

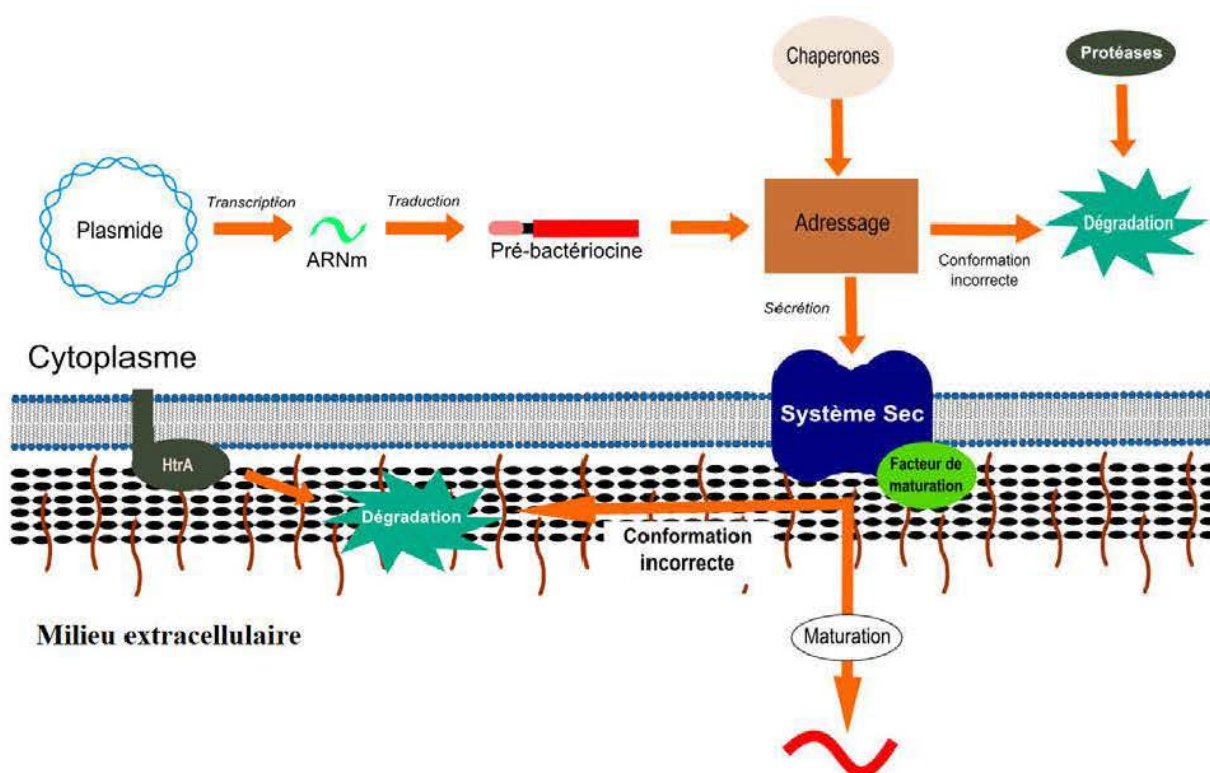


FIGURE 15 – Sécrétion de bactériocines *via* le système Sec chez *L. lactis* d'après MORELLO *et al.* 2008. Les bactériocines sont produites dans le cytoplasme en fusion avec un peptide signal permettant l'adressage vers le système Sec. Après la sécrétion, la protéine recombinante est localisée dans le protéoglycane. C'est dans le protéoglycane que la protéine recombinante acquiert sa conformation finale. Cette étape peut être catalysée par des enzymes. Une fois conformée, la protéine recombinante quitte le protéoglycane et se retrouve dans le milieu de culture. Si la protéine n'acquiert pas sa conformation finale suffisamment rapidement, la protéine recombinante est dégradée par la protéase HtrA.

I.3.5 Expression hétérologue de bactériocines recombinantes de la sous-classe IIa chez d'autres hôtes bactériens

Les problèmes d'activité observés chez *L. lactis* et chez les levures ont amené à évaluer la production de bactériocine chez d'autres hôtes. Un autre objectif visait à améliorer le potentiel antibactérien de souches présentant un intérêt en biotechnologie.

Bifidobacterium longum et *Lactobacillus reuteri* sont des souches probiotiques que l'on trouve dans le tractus digestif des êtres humains. Ces deux souches ont été transformées avec un gène de la pédiocine PA-1 fusionné à l'extrémité 5' à la séquence codant le peptide signal de l' α -amylase de *B. Longum*. Ces deux souches inhibent alors la croissance de *L. monocytogenes* (EOM *et al.* 2010 ; MOON *et al.* 2005).

Des systèmes de production ont également été développés afin de produire des quantités suffisantes de bactériocines pour faciliter leur étude en laboratoire. C'est dans ce but que le système de sécrétion de la sakacine A a été utilisé pour produire la pédiocine PA-1, la sakacine P et la piscicoline 61 dans *Lactobacillus sakei* Lb706 (producteur naturel de la sakacine A qui possède l'ensemble de l'opéron de la sakacine A). Pour cela, la séquence codant le peptide signal de la sakacine A a été placée en amont des séquences codant la pédiocine PA-1 mature et la piscicoline 61 mature (AXELSSON *et al.* 1998). Cependant, la pédiocine PA-1 produite *via* ce système est moins active que la pédiocine PA-1 produite par le producteur naturel car les ponts disulfures de la pédiocine PA-1 sont alors mal formés. Il semblerait que ce système permette de produire trois isoformes de la pédiocine PA-1 qui correspondent à trois combinaisons de ponts disulfures différents (FIMLAND *et al.* 2000 ; JOHNSEN *et al.* 2000).

L'expression de l'entéroccine A a été évaluée chez *Lb. sakei*, *P. acidilactici*, *E. faecalis*, *E. faecium* et *L. lactis* en utilisant trois peptides signaux différents (SP_{EntP}, SP_{HirJM79}, SP_{Usp45}). Il apparaît que les productions spécifiques d'entéroccine A pour les souches *L. lactis* et *Lb. sakei* sont semblables. Pour les autres souches, il est démontré que, quel que soit le peptide signal utilisé pour les souches *P. acidilactici*, *E. faecalis*, *E. faecium*, la production spécifique d'entéroccine A est inférieure à celle chez *L. lactis*. Une perte d'activité spécifique de l'entéroccine A est observée lorsqu'elle est produite chez *P. acidilactici*, *L. lactis* et *Lb. sakei*. Il s'avère que, lorsqu'elle est produite chez *E. faecalis* et *E. faecium*, l'entéroccine A a la même activité spécifique que chez le producteur naturel. Cependant, comme *E. faecium* produit une bactériocine appelée entéroccine B ayant un effet synergique avec l'entéroccine A, le gain d'activité chez *E. faecium* pourrait être dû à cet effet synergique (BORRERO *et al.* 2011a ; CASAUS *et al.* 1997).

Tableau 4 – Production hétérologue de bactériocines chez des bactéries autre que *L. lactis* et *E. coli*.

Bactériocine	Hôte utilisé pour l'expression hétérologue	Référence
Pédiocine PA-1	<i>Lactobacillus reuteri</i>	EOM <i>et al.</i> 2010
	<i>Bifidobacterium longum</i>	MOON <i>et al.</i> 2005
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	MORISSET et FRÈRE 2002
	<i>Lactobacillus sakei</i>	AXELSSON <i>et al.</i> 1998
Sakacine P	<i>Lactobacillus sakei</i>	AXELSSON <i>et al.</i> 1998
Piscicoline 61	<i>Lactobacillus sakei</i>	AXELSSON <i>et al.</i> 1998
Entéroccine A	<i>Lactobacillus sakei</i>	BORRERO <i>et al.</i> 2011a
	<i>Pediococcus acidilactici</i>	BORRERO <i>et al.</i> 2011a
	<i>Enterococcus faecalis</i>	BORRERO <i>et al.</i> 2011a
	<i>Enterococcus faecium</i>	BORRERO <i>et al.</i> 2011a
Entéroccine P	<i>Methylobacterium extorquens</i>	GUTIÉRREZ <i>et al.</i> 2005a

I.4 Stratégies de purification de bactériocines la sous-classe IIa

Les propriétés antimicrobiennes des bactériocines vis-à-vis de bactéries pathogènes font d'elles de bonnes candidates pour une application à visée commerciale. Or, une utilisation à l'échelle industrielle nécessite au préalable de connaître leur mode d'action, mécanismes d'action et leur structure, ce qui nécessite d'avoir des bactériocines avec un degré de pureté élevé. Or, la purification de bactériocines est un processus difficile qui présente deux problèmes majeurs : la faible production par le producteur naturel et l'interférence des composants présents dans le milieu de culture de la bactérie productrice (SAAVEDRA et SESMA 2011). En effet, la culture des bactéries productrices de bactériocines est généralement réalisée dans des milieux complexes. Ces milieux complexes contiennent entre 10 et 30 g/L de peptides, alors que la concentration en bactériocines du milieu atteint 10 à 100 mg/L. La faible concentration en bactériocines par rapport à la concentration totale en peptides complexifie grandement les étapes de purification (PARENTE et RICCIARDI 1999). Des milieux chimiquement définis ont été utilisés pour faciliter la purification de

bactériocines avec succès (SAAVEDRA et SESMA 2011); ces derniers ont cependant un coût prohibitif ne permettant pas leur utilisation pour une purification à grande échelle dans un but commercial.

I.4.1 Stratégie pour la purification de bactériocines recombinantes sans étiquette d'affinité

Plusieurs méthodes ont été développées pour purifier des bactériocines sans étiquette de purification, que ce soit à partir de surnageants de culture, d'un producteur naturel ou d'un producteur hétérologue.

La purification de bactériocines à partir de surnageants de culture est un procédé comportant classiquement quatre étapes (Tableau 5) (BURIANEK et YOUSEF 2000 ; HOLCK *et al.* 1996 ; SAAVEDRA et SESMA 2011) :

1. Une étape de concentration/clarification par précipitation (*e. g.* précipitation au sulfate d'ammonium, acétone, éthanol, chloroforme) (MURIANA et KLAENHAMMER 1991) ou d'extraction acido-basique (YANG *et al.* 1992).
2. Une étape de purification par chromatographie échangeuse d'ions.
3. Une étape de purification par chromatographie d'interaction hydrophobe (HIC).
4. Une dernière étape de purification par chromatographie en phase liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC) ou par ou par chromatographie d'exclusion stérique.

Cette stratégie est la plus couramment utilisée pour la purification de bactériocine. Les faibles rendements et le coût en temps sont les deux inconvénients en défaveur d'une application industrielle. Afin de simplifier la purification, une méthode en trois étapes a été développée spécifiquement pour purifier des bactériocines de la sous-classe IIa : chromatographie échangeuse de cations (1), HIC (2), RP-HPLC (3) (GUYONNET *et al.* 2000). En suivant cette méthode, les rendements de purification varient entre 10% et 60% avec un degré de pureté de 95%. Un protocole en deux étapes a également été développé mais pour une purification à grande échelle. Dans la première étape de purification, une séparation de type échangeuse de cations sur colonne SP (sulphopropyl) sépharose est effectuée à partir de la culture bactérienne. La seconde étape consiste en une séparation en phase inverse à basse pression. Un rendement de plus de 90% a été obtenu en suivant cette méthode (UTENG *et al.* 2002).

Des techniques de chromatographie d'immuno-affinité ont également été mises au point pour purifier des bactériocines. Cette technique a été peu utilisée et il semble que les rendements dépendent largement de la bactériocine que l'on souhaite purifier. La pédiocine PA-1, l'entéroccine P et la sakacine A ont été purifiées en utilisant la chromatographie d'immuno-affinité (NAGHMOUCHI *et al.* 2008 ; SAAVEDRA et SESMA 2011). Par exemple, environ 4,1 - 5,9 µg d'entéroccine P ont pu être purifiés à partir de 4,5 mL de culture en utilisant la chromatographie d'immuno-affinité (GUTIÉRREZ *et al.* 2004).

La propriété qu'ont les bactériocines d'interagir avec les membranes a aussi été utilisée à des fins de purification (YANG *et al.* 1992). Dans ce cas, la purification se décompose en deux étapes : les bactériocines sont mises en présence des bactéries productrices à une valeur de pH (5 - 7) favorisant l'ancrage de la bactériocine à la membrane bactérienne, puis le pH est diminué jusqu'à une valeur pour laquelle la bactériocine se décroche de la bactérie productrice. Il a été montré que l'adsorption sur des bactéries pouvait être remplacée par une adsorption sur du silicate de calcium (COVENTRY *et al.* 1996), de l'acide silicique, mais aussi des balles de céréales (JANES *et al.* 1998).

Tableau 5 – Purification de bactériocines produites sans étiquette de purification dans le milieu de culture.

Bactériocine de la classe IIa	Stratégie de la purification	Référence
Pédiocine PA-1, Sakacine P, Curvacine A, Leucocine A, Lactococcine A	Chromatographie échangeuse de cations, RP-HPLC	UTENG <i>et al.</i> 2002
Entéroccine P	Chromatographie d'immuno-affinité	GUTIÉRREZ <i>et al.</i> 2004
	Adsorption sur résine XAD-16, chromatographie échangeuse de cations, RP-HPLC	GUTIÉRREZ <i>et al.</i> 2004
	Précipitation au sulfate d'ammonium, chromatographie d'exclusion stérique, chromatographie échangeuse de cations, HIC, RP-HPLC	GUTIÉRREZ <i>et al.</i> 2004
Mésentericine Y105, Sakacine A, Sakacin P, Entéroccine A, Pédiocine PA-1, Divercine V41	Chromatographie échangeuse de cations, HIC, RP-HPLC	GUYONNET <i>et al.</i> 2000
Pédiocine PA-1	Précipitation à l'éthanol, focalisation isoélectrique, ultrafiltration	VENEMA <i>et al.</i> 1997
	Chromatographie d'immuno-affinité	NAGHMOUCHI <i>et al.</i> 2008
Divergicine M35	Chromatographie échangeuse de cations, HIC, RP-HPLC	TAHIRI <i>et al.</i> 2004
Piscicocine CS526	Précipitation au sulfate d'ammonium, chromatographie d'exclusion stérique, chromatographie échangeuse de cations, HIC, RP-HPLC	YAMAZAKI <i>et al.</i> 2005
Plantaricine C	Précipitation au sulfate d'ammonium, HIC, FPLC échangeuse de cations	GONZALEZ <i>et al.</i> 1994
Plantaricine 423	Concentration par évaporation, ultrafiltration, RP-HPLC	REENEN <i>et al.</i> 1998
Pédiocine PA-1	Adsorption sur résine amberlite, HIC, RP-HPLC	KAUR <i>et al.</i> 2004

Tableau 5 – Suite

Bactériocine de la classe IIa	Stratégie de la purification	Référence
Mundticine KS	Précipitation au sulfate d'ammonium, chromatographie échangeuse de cations	KAWAMOTO <i>et al.</i> 2002
Entérocline P	Précipitation au sulfate d'ammonium, chromatographie d'exclusion stérique, chromatographie échangeuse de cations, HIC, RP-HPLC	CINTAS <i>et al.</i> 1997
Leucocine A	Précipitation au sulfate d'ammonium, adsorption sur résine amberlite, chromatographie d'exclusion stérique, RP-HPLC	HASTINGS <i>et al.</i> 1991
Piscicoline 126	Précipitation au sulfate d'ammonium, chromatographie échangeuse de cations, RP-HPLC	JACK <i>et al.</i> 1996
Acidocine A	Précipitation au sulfate d'ammonium, chromatographie d'exclusion stérique, chromatographie échangeuse de cations, RP-HPLC	KANATANI <i>et al.</i> 1995
Sakacine A	Chromatographie d'immuno-affinité	GUTIÉRREZ <i>et al.</i> 2004

I.4.2 Purification de bactériocines recombinantes par chromatographie d'affinité *via* l'utilisation d'une étiquette

L'expression hétérologue de protéines permet de modifier à façon la bactériocine grâce aux outils du génie génétique. C'est pourquoi, lorsque l'on produit une protéine de façon hétérologue, il est commun de lui ajouter une étiquette d'affinité pour optimiser la purification. Une étiquette d'affinité est une séquence peptidique ou protéique que l'on ajoute à l'une des extrémités de la protéine recombinante et dont le rôle est de changer les propriétés d'affinité de la protéine, ce qui facilite en aval sa purification par chromatographie. Les étiquettes d'affinité doivent permettre la purification en une étape d'adsorption, avoir un effet minimum sur la fonction biologique de la protéine recombinante, idéalement être applicables à plusieurs protéines, et surtout être facilement séparable de la protéine recombinante. Il existe plusieurs étiquettes d'affinité et à chaque étiquette convient un protocole de purification particulier (TERPE 2003 ; Tableau 6).

L'utilisation d'étiquettes d'affinité pour purifier des bactériocines a surtout été mise

en œuvre dans le cadre de l'expression hétérologue chez *E. coli*. Dans la majorité des cas, la bactériocine est liée en N-terminal à une thiorédoxine et à une étiquette histidine (thiorédoxine-histag-bactériocine). La bactériocine recombinante est produite au niveau intracellulaire, une étape de lyse cellulaire est donc nécessaire avant le passage sur colonne de chromatographie. Des corps d'inclusion peuvent se former et une étape de renaturation dans un tampon contenant un détergeant doux et un couple oxydo-réducteur peut être nécessaire. Pour séparer le domaine de fusion (Thiorédoxine-histag) de la bactériocine, on peut faire appel à des méthodes enzymatiques ou chimiques. Pour une coupure enzymatique, il est fréquent d'insérer un site de coupure de l'entérokinase entre le domaine de fusion et la bactériocine. Pour une coupure chimique, le bromure de cyanogène est souvent utilisé pour cliver la protéine de fusion après une méthionine. L'efficacité est globalement meilleure lorsque la méthode chimique est utilisée. Finalement, la thiorédoxine et la bactériocine sont séparées par coagulation thermique, *via* un deuxième passage sur colonne d'affinité, une ultrafiltration, ou *via* RP-HPLC. Une étiquette histidine a été utilisée pour purifier la pédiocine PA-1 (BEAULIEU *et al.* 2007 ; HALAMI et CHANDRASHEKAR 2007 ; LIU *et al.* 2011 ; MOON *et al.* 2006), l'entérocin P (CUOZZO *et al.* 2006), la piscicoline 126 (GIBBS *et al.* 2004), les carnobactériocines BM1 et B2 (JASNIEWSKI *et al.* 2008c), la divercine RV41 (RICHARD *et al.* 2004 ; RIHAKOVA *et al.* 2009 ; YILDIRIM *et al.* 2007). D'autres étiquettes d'affinité ont été utilisées pour optimiser la purification de bactériocines. Le domaine de liaison à la chitine a été utilisé pour purifier la divercine V41, l'entérocin P et la piscicoline 126 produite chez *E. coli* (INGHAM *et al.* 2005). Le S-tag a été utilisé pour purifier l'entérocin A (KLOCKE *et al.* 2005), et la Glutathione S-transferase a été utilisée pour purifier la pédiocine PA-1 (SONG *et al.* 2013). La protéine de liaison au maltose a été utilisée pour purifier la carnobactériocine B2 (SPRULES *et al.* 2004).

Les étiquettes d'affinités sont peu utilisées pour la purification de bactériocines recombinantes quand elles sont produites chez les levures ou les bactéries lactiques, car la bactériocine recombinante est alors majoritairement sécrétée dans le surnageant. A notre connaissance, le seul exemple est l'entérocin P qui a été produite en fusion avec une étiquette histidine chez *L. lactis*. L'étiquette histidine a été ajoutée en position C-terminale et ne semble pas interférer avec l'activité de la bactériocine (HERRANZ et DRIESSEN 2005).

Tableau 6 – Etiquettes d'affinité utilisées pour la purification de protéines recombinantes d'après TERPE 2003

Étiquette d'affinité	Taille (en nombre d'acides aminés)	Séquence	Matrice de purification	Condition d'élution
Poly-Arg	5 – 6	RRRRR	Résine échangeuse de cations	Gradient de NaCl (0 à 400 mM)
Poly-His	2-10	HHHHHH	Ni ²⁺ -NTA, Co ²⁺ -CMA	Gradient de NaCl (0 à 400 mM), faible valeur de pH
FLAG	8	DYKDDDDK	Anticorps monoclonal anti-FLAG	EDTA (2 – 5 mM)
Strep-tag II	8	WSHPQFEK	Strep-Tactin	2,5 mM de desthiobiotine
c-myc	11	EQKLISEEDL	Anticorps monoclonal	Faible valeur de pH
S	15	KETAAAKFER-QHMS	fragment S de la RNaseA	3M de guanidine thiocyanate, 0,2M de citrate à pH3, 3 M de chlorure de magnésium
HAT	19	KDHLIHNVHKEF-HAHAHNK	Co ²⁺ -CMA	150 mM d'imidazole, faible valeur de pH
Peptide de liaison à la calmoduline	26	KRRWKKNFIAY-SAANRFKKISSS-GAL	Calmoduline	EGTA avec ou sans NaCl (1 M)
Domaine de liaison à la cellulose	27-189	Domaine	Cellulose	Famille I : guanidine HCl ou urée > 4 M, famille II/III : éthylène glycole

Tableau 6 – Suite

Étiquette d'affinité	Taille (en nombre d'acides aminés)	Séquence	Matrice de purification	Condition d'élution
SBP	38	MDEKTTG- WRGGHVVEGLA- GELEQLRAR- LEHHPQGQREP	Streptavidine	Biotine (2 mM)
Domaine de liaison à la chitine	51	TNPGVSAWQVN- TAYTAGQLV- TYNGKTYKCL- QPHTSLAG- WEPSNVPALWQLQ	Chitine	En fusion avec l'intéine : 30 – 50 mM de dithiothreitol, de β -mercaptoéthanol ou de cystéine
Glutathione S-transferase	211	Protéine	Glutathione	5 — 10 mM de glutathion réduit
La protéine de liaison au maltose	396	Protéine	Amylose	10 mM de maltose

I.5 Formation des ponts disulfures chez les bactéries

Un enjeu majeur lors de la production hétérologue de protéines, et notamment de bactériocines de la classe IIa, est la formation correcte des ponts disulfures. En effet, dans la majorité des cas, l'activité de la protéine d'intérêt est dépendante de la présence de ponts disulfures (exemples : pro-insuline (WINTER *et al.* 2000), brain-derived neurotrophic factor (HOSHINO *et al.* 2002), insulin-like growth factor (JOLY *et al.* 1998), nerve growth factor (KUROKAWA *et al.* 2001), lipases (LIEBETON *et al.* 2001), et des fragments d'anticorps (PROBA *et al.* 1995)).

Pendant plusieurs années, il a été admis que la formation des ponts disulfures des protéines bactériennes était spontanée. La formation spontanée existe en effet pour certaines protéines : les ponts disulfures de la protéine CrtJ se forment correctement et spontanément en présence d'oxygène, et (MASUDA *et al.* 2002) ces derniers peuvent aussi être formés spontanément pendant la sécrétion *via* le "*periplasmic-independent type I secretion system*" (FERNÁNDEZ et DE LORENZO 2001). Cependant, dans la majorité des cas, la formation des ponts disulfures est lente et aspécifique (ANFENSEN 1973), et la formation correcte des ponts est dépendante d'enzymes appelées TDOR. Ces protéines sont caractérisées par la présence d'un motif catalytique CxxC/S qui est responsable de la formation, de l'isomérisation et de la réduction des ponts disulfures (FOMENKO et GLADYSHEV 2002 ; KOUWEN *et al.* 2008). Les TDOR cytoplasmiques sont généralement réductrices, tandis que les TDOR extra-cytoplasmiques fonctionnent comme des isomérases ou des oxydases.

I.5.1 Les thiol-disulfides oxydoréductases de la bactérie *E. coli*

Escherichia coli possède six TDOR périplasmiques (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD, DsbE, et DsbG ; FABIANEK *et al.* 2000). C'est dans le périplasme que les ponts disulfures sont formés chez *E. coli* comme chez les autres bactéries gram-négatives (Figure 16).

DsbA est la principale protéine impliquée dans la formation des ponts disulfures chez *E. coli*, elle possède plus de 300 substrats cellulaires. A l'état oxydé, DsbA peut engager une réaction d'oxydoréduction avec une protéine substrat se traduisant par la formation d'un pont disulfure dans la protéine cible et par la réduction du pont disulfure de DsbA. Une fois réduite, DsbA est ré-oxydé par DsbB et peut ainsi reprendre son rôle d'oxydant. DsbB est une protéine transmembranaire qui possède 4 cystéines dans sa partie périplasmique et qui fait partie de la famille des quinones oxydoréductases. Les deux cystéines du côté N-terminal sont organisées en un motif CxxC (C41 et C44) tandis que les 2 autres cystéines sont séparées par 25 résidus (C104 et C130) (JANDER *et al.* 1994). Le pont formé par les

cystéines C104 et C130 est responsable de la ré-oxydation de DsbA. Ce pont est ensuite ré-oxydé par le pont formé par les cystéines C41 et C44, qui lui est ré-oxydé par une ubiquinone en aérobie (BADER *et al.* 1998 ; GRAUSCHOPF *et al.* 2003 ; GUILHOT *et al.* 1995 ; KISHIGAMI *et al.* 1995), et par une ménaquinone en anaérobie (Figure 16 ; COLLET et BARDWELL 2002).

DsbC, une TDOR isomérase, est capable de réarranger des cystéines improprement appariées. Cette protéine contient un motif spécifique FxxxxCxxC (SHEVCHIK *et al.* 1994) et contient 2 ponts disulfures (C98-C101 et C141-C163), dont un formant le motif CxxC (C98-C101), caractéristique des protéines TDOR (Figure 16). Seul le pont C98-C101 est réactif, l'autre semble avoir un rôle structural. Dans le périplasme, le motif CxxC de DsbC doit être sous une forme réduite pour exercer son rôle d'isomérase. La protéine est maintenue sous forme réduite grâce à la protéine transmembranaire DsbD (JOLY et SWARTZ 1997) : DsbD transfère l'électron d'une thiorédoxine cytoplasmique vers DsbC pour la maintenir réduite. La thiorédoxine cytoplasmique est ensuite réduite par une autre thiorédoxine cytoplasmique (HOLMGREN 1989 ; RIETSCH *et al.* 1997). DsbC est la Dsb qui possède la plus forte similarité avec les protéines disulfides isomérases eucaryotes (CHEN *et al.* 1999 ; MISSIAKAS *et al.* 1994 ; SHEVCHIK *et al.* 1994). Comme DsbC, les PDI ont une fonction isomérase mais elles ont en plus une fonction oxydase (CAI *et al.* 1994 ; DELOM *et al.* 2001 ; YAO *et al.* 1997). DsbG est une autre TDOR de *E. coli* dont la séquence est similaire à DsbC, elle semble être elle aussi une isomérase, mais avec un spectre d'action plus réduit que celui de DsbC (STRAATEN *et al.* 1998). La TDOR d'*E. coli* DsbE est également maintenue dans un état réduit par DsbD. Le gène codant DsbE fait partie du cluster de gène *ccmABCDEFGH* qui est essentiel pour la synthèse du cytochrome C (THÖNY-MEYER *et al.* 1995).

A Formation des ponts disulfures chez *E. coli* B Isomérisation des ponts disulfures chez *E. coli*

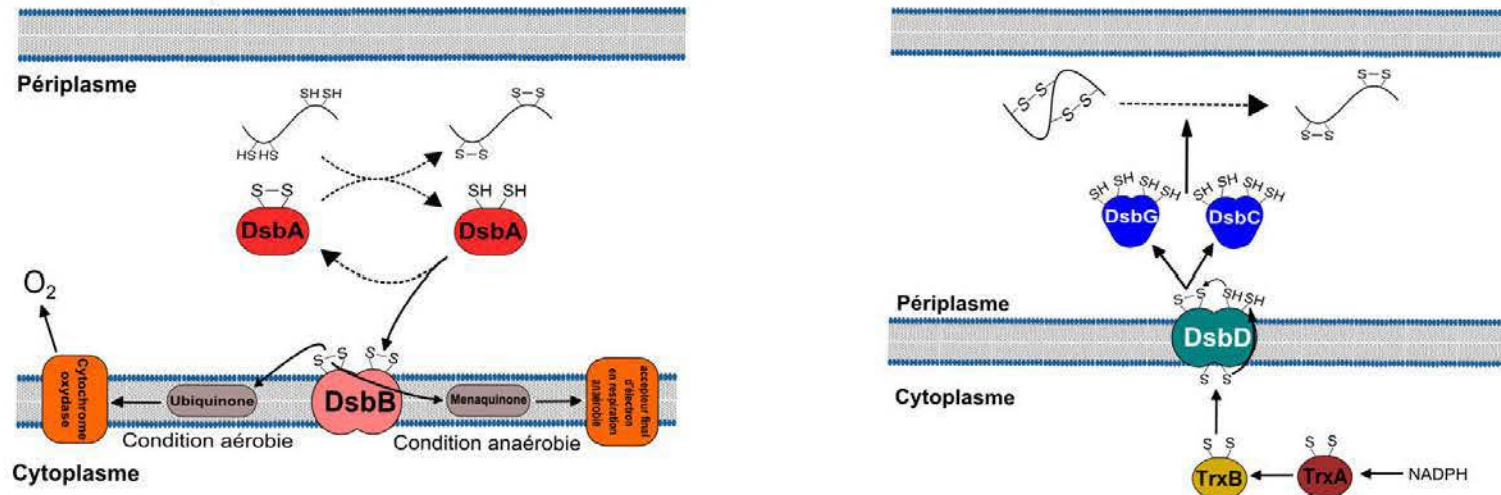


FIGURE 16 – Formation des ponts disulfures chez *E. coli* via le système des Dsb d'après COLLET et BARDWELL 2002. Chez *E. coli*, les ponts disulfures sont formés dans le périplasm. (A) Les cystéines réduites des protéines substrats sont oxydées par DsbA. DsbA est ré-oxydée par la protéine DsbB. En condition aérobie, DsbB est ré-oxydée par l'ubiquinone, laquelle est régénérée par le cytochrome oxydase. En respiration anaérobie, DsbB est ré-oxydée par une ménaquinone, laquelle est régénérée par l'accepteur final de l'électron. Le couple DsbA/DsbB forme ainsi la voie oxydative. (B) Il existe également une voie dont le rôle est d'isomériser des protéines dont les ponts disulfures sont appariés improprement. La réaction d'isomérisation peut être catalysée par deux protéines : DsbG ou DsbC. Pour catalyser la réaction d'isomérisation, ces deux protéines doivent être sous forme réduite. Elles sont maintenues sous forme réduite grâce à la protéine membranaire DsbD, laquelle est elle-même maintenue dans un état réduit par des thiorédoxines cytoplasmiques. Les flèches pleines indiquent le flux d'électrons et les flèches en pointillé indiquent la formation/isomérisation des ponts disulfures des protéines substrats.

I.5.2 Les thiol-disulfides oxydoréductases de la bactérie *B. subtilis*

Chez *Bacillus subtilis* quatre TDOR ont été décrites : BdbA, BdbB, BdbC, BdbD (Figure 17). Les gènes *bdbA* et *bdbB* font partie du *locus* comprenant également les gènes de biosynthèse de la sublancine 168, une bactériocine comportant deux ponts disulfures (PAIK *et al.* 1998). Malgré cette proximité génétique, *bdbA* peut être inactivée sans affecter la production de la sublancine 168. Il semblerait que BdbC soit capable de compenser la perte de BdbA car un double mutant *bdbA-bdbC* ne produit pas de sublancine 168 active et que la délétion simple de *bdbB* affecte la production de la sublancine 168. Les protéines BdbB et BdbC sont des homologues de DsbB et semblent respectivement responsables de la ré-oxydation de BdbA et BdbD (Figure 17; DORENBOS *et al.* 2002).

Milieu extracellulaire

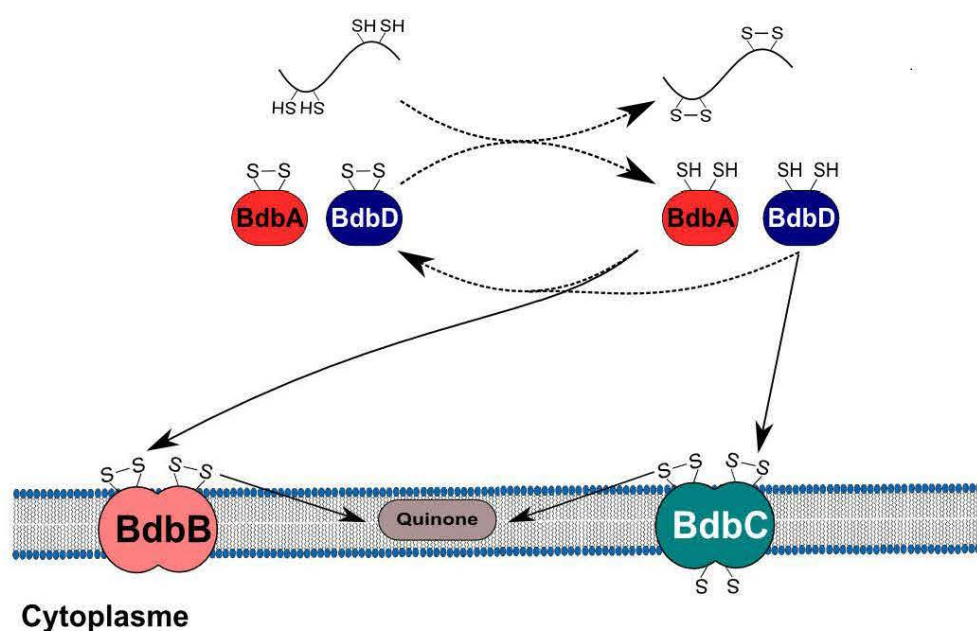


FIGURE 17 – Modèle du Système Bdb chez *B. subtilis* 168 adapté de DORENBOS 2004. Les protéines BdbA et BdbD sont impliquées dans la formation des ponts disulfures des protéines extracellulaires. Elles sont ré-oxydées par les protéines transmembranaires BdbB et BdbC. La protéine BdbA est principalement ré-oxydée par la protéine BdbB et la protéine BdbD est principalement ré-oxydée par la protéine BdbC. Par analogie de séquence avec la protéine DsbB, il a été supposé que les protéines BdbB et BdbC étaient ré-oxydées par la chaîne respiratoire *via* des quinones. Les flèches pleines indiquent le flux d'électrons et les flèches en pointillé indiquent la formation des ponts disulfures.

I.5.3 Les thiol-disulfides oxydoréductases chez les autres bactéries gram-positives

Peu de choses sont connues sur la formation des ponts disulfures chez les bactéries gram-positives. La recherche par homologie de séquences de TDOR chez les autres bactéries gram-positives est difficile car elles présentent en général peu de similarité de séquences entre elles (15 % - 25 %) (DANIELS *et al.* 2010 ; DAVEY *et al.* 2013). Cependant, plusieurs TDOR ont été décrites chez les firmicutes. Deux TDOR ont été caractérisées chez *Corynebacterium glutamicum* et l'une d'elle semble conservée dans le *phylum* des *Actinobacteria*. Une TDOR a aussi été caractérisée chez *S. aureus*, nommée SaDsbA, mais aucun substrat n'a pu lui être attribué (DUMOULIN *et al.* 2005). Une TDOR a aussi été isolée chez *Streptococcus gordonii* (DAVEY *et al.* 2013) et une autre impliquée dans la biosynthèse de la bactériocine thermophiline 13 chez *Streptococcus thermophilus* a été isolée (FONTAINE et HOLS 2008). Cependant, il ne semble pas y avoir d'homologue des protéines DsbB, DsbD, BdbB et BdbC chez ces firmicutes. Une étude a démontré que la vitamine K époxyde oxydoréductase (VKOR) est capable de régénérer DsbA chez *E. coli* (DUTTON *et al.* 2008). Il existe des VKOR chez *Corynebacterium glutamicum*, c'est pourquoi il a été suggéré que les VKOR pouvaient être responsables de la régénération des TDOR chez cette bactérie. Chez les *S. aureus*, SaDsbA est capable de former des ponts disulfures dans une souche d'*E. coli* pour laquelle les gènes *dsbA* et *dsbB* ont été inactivés, mais aussi dans une souche de *B. subtilis* pour laquelle les gènes *bdbB* et *bdbC* ont été inactivés. En conséquence, il a été supposé que SaDsbA était régénérée sans quinone oxydoréductase, et qu'elle l'était *via* une protéine encore inconnue ou *via* les composants oxydés du milieu (DUMOULIN *et al.* 2005 ; KOUWEN *et al.* 2007). Les analyses structurales de SaDsbA ont révélé que les formes réduites et oxydées avaient la même stabilité thermodynamique, ce qui permettrait une ré-oxydation efficace *via* les composés oxydés du milieu (HERAS *et al.* 2008).

I.5.4 Les thiol-disulfides oxydoréductases et les bactériocines de la sous-classe IIa

Les bactériocines de la sous-classe IIa ont 1 ou 2 ponts disulfures. Une étude a démontré que les ponts disulfures d'une pédiocine PA-1 synthétique étaient capables de se former correctement de manière spontanée (FIMLAND *et al.* 1996). Cependant, il a été décrit par la même équipe que les ponts disulfures de la pédiocine étaient mal formés quand celle-ci est produite de façon hétérologue par *Lb. sakei* (FIMLAND *et al.* 2000). Des analyses par RP-HPLC ont révélé que *Lb. sakei* produisait trois isoformes de la pédiocine, alors que le producteur naturel n'en produit qu'une. Les trois isoformes correspondent aux trois

appariements possibles des cystéines. Il en a été déduit qu'il existait chez le producteur naturel une protéine catalysant la formation des ponts disulfures de la pédiocine PA-1.

Objectifs de la thèse

L'un des enjeux majeurs de la production hétérologue est la production de protéines en grande quantité à l'état natif. *Lactococcus lactis* est un hôte attractif par rapport à *Escherichia coli* pour la sécrétion de protéines recombinantes, en particulier quand il s'agit de produire des bactériocines de la classe IIa : *L. lactis* peut en effet sécréter ces peptides antibactériens dans le milieu extracellulaire sous forme active sans effet délétère pour sa survie et sa croissance. L'objectif de cette thèse est d'améliorer la production hétérologue de la pédiocine PA-1, une bactériocine modèle, chez *L. lactis* aux niveaux quantitatif et qualitatif en ciblant respectivement les étapes de sécrétion et de maturation post-traductionnelle.

Un peptide signal comme celui de la protéine Usp45 de *L. lactis* peut être fusionné à l'extrémité N-terminale de la protéine d'intérêt pour permettre sa sécrétion via le système général de sécrétion. Il est décrit que la nature de la séquence protéique en aval du site de coupure du peptide signal peut avoir un impact important sur l'efficacité de l'export (LE LOIR *et al.* 1998 ; LE LOIR *et al.* 2005). En effet, lorsque la protéine d'intérêt présente une charge positive à l'extrémité N-terminale, l'export de la protéine recombinante est diminué de façon drastique. Il a ainsi été envisagé de tester la production de la pédiocine PA-1, via le système Sec et à l'aide de la séquence SP_{Usp45}, sous trois formes : une forme strictement constituée de la séquence mature de la pédiocine, et deux peptides dérivés de la pédiocine auxquels ont été fusionnés les pro-peptides SD et LEISSTCDA. L'insertion du pro-peptide LEISSTCDA entre le peptide signal et la protéine NucB permet en effet d'améliorer sa production de 3 mg/L à 15 mg/L, démontrant ainsi l'importance de la nature des acides aminés localisés juste derrière le peptide signal (LE LOIR *et al.* 1998 ; MORELLO *et al.* 2008 ; PONTES *et al.* 2011). Outre le peptide LEISSTCDA, le pro-peptide SD a été fusionné à la bactériocine divercine RV41 et sécrété de façon hétérologue chez *L. lactis*. Ce pro-peptide est le résultat du clonage de la séquence codant la divercine dans le vecteur d'expression pSec : l'enzyme de restriction *Nsi*I utilisée code en effet la séquence peptidique SD (BERMÚDEZ-HUMARÁN *et al.* 2007). Comme le résidu aspartate du pro-peptide SD est chargé négativement, une hypothèse vraisemblable est que le pro-

peptide SD permette d'améliorer la sécrétion des protéines recombinantes. Toutefois, à notre connaissance, aucune étude ne décrit l'impact réel de ce pro-peptide sur l'efficacité de la sécrétion et son impact sur le pouvoir antibactérien d'une bactériocine de la classe IIa.

FIMLAND *et al.* 2000 ont montré que trois isoformes de la pédiocine sont sécrétées lorsque celle-ci est produite de façon hétérologue chez *Lb. sakei*. Ces trois isoformes correspondent à des mésappariements de cystéines conduisant à la formation de ponts disulfures non natifs. Par ailleurs, il est décrit que la production hétérologue de bactériocines de la classe IIa chez *L. lactis* permet d'obtenir des bactériocines recombinantes faiblement actives par rapport aux bactériocines sauvages (BERMÚDEZ-HUMARÁN *et al.* 2007 ; BORRERO *et al.* 2011a ; JIMÉNEZ *et al.* 2013 ; MARTÍN *et al.* 2007a,b). Un objectif de cette thèse est d'améliorer du point de vue qualitatif la production de pédiocine en identifiant un procédé moléculaire permettant de favoriser la formation de ponts disulfures natifs chez *L. lactis*.

Chapitre II

Matériel & Méthodes

II.1 Microbiologie

II.1.1 Souches et conditions de culture

Les souches utilisées dans cette étude sont présentées dans le tableau 7. Elles proviennent de la collection privée du laboratoire (Laboratoire de microbiologie alimentaire ; LMA) ou de collections publiques et ont été conservées à -80°C dans un milieu supplémenté avec 10% de glycérol.

a) *Lactococcus lactis*

Lactococcus lactis NZ9000 et *L. lactis* ML3 ont été cultivées en bouillon M17 (Difco, Sparks, USA) supplémenté avec 1% de glucose (m/v) (bouillon GM17) à 30°C. Les souches de *L. lactis* transformées ont été cultivées dans un milieu GM17 supplémenté avec 10 µg/mL de chloramphénicol et/ou d'érythromycine (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA).

b) *Lactobacillus plantarum* LMAX

Lactobacillus plantarum LMAX est un producteur naturel de la pédiocine PA-1. Cette souche a été isolée à partir d'un ferment (HOLDBACTM *Listeria* ; Danisco, Copenhague, Danemark) et a été cultivée dans un bouillon de Man, Rogosa et Sharpes (MRS, Biokar, Beauvais, France) à 30°C.

c) *Escherichia coli*

Escherichia coli a été cultivée en bouillon LB (Lysogeny Broth) sous agitation (200 rpm ; Amplitude : 20 mm) en condition aérobie à 37°C. Les souches *E. coli* transformées ont été cultivées dans un bouillon LB supplémenté avec 10 µg/mL de chloramphénicol et/ou 180 µg/mL d'érythromycine.

d) *Carnobacterium maltaromaticum*

Les souches appartenant à l'espèce *C. maltaromaticum* ont été cultivées dans un bouillon de tryptone et de soja (TSB ; Biomérieux, Marcy-l'Étoile, France) supplémenté avec 6 g/L d'extrait de levure (TSBYE) à 30°C. Les souches dérivées de *C. maltaromaticum* DSM20730 transformées ont été cultivées dans un bouillon TSBYE supplémenté avec 5 µg/mL de chloramphénicol et/ou d'érythromycine.

e) *Listeria monocytogenes* EGDe *lux*

La souche *Listeria monocytogenes* EGDe *lux* (RIEDEL *et al.* 2007) a été cultivée dans un bouillon TSBYE à 30°C.

Tableau 7 – Souches utilisées.

Bactérie	Description	Référence
<i>Lactococcus lactis</i> NZ9000	Souche dérivée de <i>L. lactis</i> MG1363 ; <i>pepN::nisRK⁺</i>	KUIPERS <i>et al.</i> 1998
<i>L. lactis</i> ML3 ^a (= NCDO 763)	Souche transformée avec le pRSN <i>pedA</i> contenant l'ensemble de l'opéron pédiocine sous le contrôle du promoteur P _{<i>nisA</i>}	RENYE et SOMKUTI 2010
<i>L. lactis</i> NZ9000_pSec:: <i>nucB</i>	Souche <i>L. lactis</i> NZ9000 transformée avec le plasmide pSec:: <i>nucB</i> contenant le gène <i>nucB</i> sous le contrôle du promoteur P _{<i>nisA</i>}	Cette étude
<i>L. lactis</i> NZ9000_pSec:: <i>rpedA</i>	Souche <i>L. lactis</i> NZ9000 transformée avec le plasmide pSec:: <i>rpedA</i> contenant le gène $\Delta_{sp}pedA$ sous le contrôle du promoteur P _{<i>nisA</i>}	Cette étude
<i>L. lactis</i> NZ9000_pSec:: <i>s-rpedA</i>	Souche <i>L. lactis</i> NZ9000 transformée avec le plasmide pSec:: <i>s-rpedA</i> contenant le gène <i>sd::\Delta_{sp}pedA</i> sous le contrôle du promoteur P _{<i>nisA</i>}	Cette étude
<i>L. lactis</i> NZ9000_pSec:: <i>l-rpedA</i>	Souche <i>L. lactis</i> NZ9000 transformée avec le plasmide pSec:: <i>l-rpedA</i> contenant le gène <i>leisstcda::\Delta_{sp}pedA</i> sous le contrôle du promoteur P _{<i>nisA</i>}	Cette étude
<i>L. lactis</i> NZ9000_pSec:: <i>h-rpedA</i>	Souche <i>L. lactis</i> NZ9000 transformée avec le plasmide pSec:: <i>h-rpedA</i> contenant le gène <i>histag::\Delta_{sp}pedA</i> sous le contrôle du promoteur P _{<i>nisA</i>}	Cette étude

a. Souches issues de la collection : *National Collection of Food Bacteria* (NCDO)

Tableau 7 - Suite

Bactérie	Description	Référence
<i>L. lactis</i> NZ9000_pOri::pedB	Souche <i>L. lactis</i> NZ9000 transformée avec le plasmide pOri::pedB contenant le gène <i>pedB</i> sous le contrôle du promoteur P ₂₃	Cette étude
<i>L. lactis</i> NZ9000_pSec::nucB_pOri::pedC	Souche <i>L. lactis</i> NZ9000 transformée avec le plasmide pSec::nucB contenant le gène <i>nucB</i> sous le contrôle du promoteur P _{nisA} et le plasmide pOri::pedC contenant le gène <i>pedC</i> sous le contrôle du promoteur P ₂₃	Cette étude
<i>L. lactis</i> NZ9000_pSec::rpedA_pOri::pedC	Souche <i>L. lactis</i> NZ9000 transformée avec le plasmide pSec::rpedA contenant le gène $\Delta_{sp}pedA$ sous le contrôle du promoteur P _{nisA} et le plasmide pOri::pedC contenant le gène <i>pedC</i> sous le contrôle du promoteur P ₂₃	Cette étude
<i>L. lactis</i> NZ9000_pSec::s-rpedA_pOri::pedC	Souche <i>L. lactis</i> NZ9000 transformée avec le plasmide pSec::s-rpedA contenant le gène $sd::\Delta_{sp}pedA$ sous le contrôle du promoteur P _{nisA} et le plasmide pOri::pedC contenant le gène <i>pedC</i> sous le contrôle du promoteur P ₂₃	Cette étude
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> DSM20730 ^b	Souche sensible à la pédiocine	MILLER <i>et al.</i> 1974
<i>C. maltaromaticum</i> DSM20730_pRSNpedA	Souche transformée avec le pRSNpedA contenant l'opéron <i>pedABCD</i> sous le contrôle du promoteur P _{nisA}	Cette étude

^b. Souches issues de la collection : *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSMZ)

Tableau 7 - Suite

Bactérie	Description	Référence
<i>C. maltaromaticum</i> DSM20730_pSec:: <i>nucB</i> _pOri23	Souche <i>C. maltaromaticum</i> DSM20730 transformée avec le plasmide pSec:: <i>nucB</i> et le plasmide pOri23	Cette étude
<i>C. maltaromaticum</i> DSM20730_pSec:: <i>nucB</i> _pOri:: <i>pedB</i>	Souche <i>C. maltaromaticum</i> DSM20730 transformée avec le plasmide pSec:: <i>nucB</i> et le plasmide pOri:: <i>pedB</i> contenant le gène <i>pedB</i> sous le contrôle du promoteur P ₂₃	Cette étude
<i>C. maltaromaticum</i> F2	Souche isolée d'un camembert	RAHMAN <i>et al.</i> 2014
<i>C. maltaromaticum</i> F88	Souche isolée d'un fromage pérail	CAILLIEZ-GRIMAL <i>et al.</i> 2007
<i>C. maltaromaticum</i> CIP101342 ^c	Souche isolée de sang humain	RAHMAN <i>et al.</i> 2014
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F^- , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> ($r_K^- m_K^+$), <i>glnV44</i> , <i>thi-1</i> <i>deoR</i> , <i>gyrA96</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , $\Delta(lacZYA-argF)U169$, λ^- , (<i>II80dlac</i> $\Delta(lacZ)$ <i>M15</i>)	WOODCOCK <i>et al.</i> 1989
<i>E. coli</i> DH5α_pOri:: <i>pedB</i>	Souche <i>E. coli</i> DH5α transformée avec le plasmide pOri:: <i>pedB</i> contenant le gène <i>pedB</i> sous le contrôle du promoteur P ₂₃	Cette étude
<i>Listeria monocytogenes</i> EGDe <i>lux</i>	Souche dérivée de <i>L. monocytogenes</i> EGDe. Le plasmide pPL2 <i>lux</i> _{pHelp} a été intégré au chromosome au niveau du gène tRNA ^{Arg} -attB'	RIEDEL <i>et al.</i> 2007
<i>Lactobacillus plantarum</i> LMAX	Souche productrice de pédiocine, isolée à partir d'un fromage HOLDBAC TM <i>Listeria</i>	Dupont Danisco

c. Souches issues de la collection de l'Institut Pasteur

II.2 Biologie moléculaire

II.2.1 Gènes synthétiques

Les gènes synthétiques ($P_{32_}\Delta_{sp}pedA$, $P_{32_}sd::\Delta_{sp}pedA$, $P_{32_}leisstcda::\Delta_{sp}pedA$ et $histag::\Delta_{sp}pedA$) utilisés dans cette étude ont été commandés chez Genscript USA Inc. (Piscataway, USA). Hormis le gène $histag::\Delta_{sp}pedA$, ces gènes ont tous été conçus sur le modèle suivant : un site de restriction *Bgl*II, la séquence nucléotidique du promoteur P_{32} , la séquence sp_{usp45} codant le peptide signal, puis une séquence codant la pédiocine mature sauvage ou modifiée (par fusion à l'extrémité 5' d'une séquence codant le peptide SD ou LEISSTCDA) ; en 3' de la séquence figure un site *Eco*RI.

II.2.2 Réaction de polymérisation en chaîne

Les plasmides utilisés dérivent des plasmides pSec::*nucB* et pOri23 et sont listés dans le tableau 9. Ils ont été modifiés en remplaçant la séquence codant la protéine NucB par un gène synthétique ou par insertion de gènes provenant de la souche *Lb. plantarum* LMAX (*pedB*, *pedC*). Les protocoles, les amorces (Eurogentec, Seraing, Belgique) et les noms des produits de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) sont indiqués dans le tableau 8. Pour les PCR, une polymérase de haute-fidélité a été utilisée (*Pfx*50 ; Invitrogen, Carlsbad, USA).

Les produits de PCR P32PEDA, P32SD et P32LEI ont été obtenus en utilisant les gènes synthétiques $P_{32_}sd::\Delta_{sp}pedA$ et $P_{32_}leisstcda::\Delta_{sp}pedA$ comme matrice.

Les produits de PCR PCRSD et PCRLEI ont été obtenus en utilisant respectivement, les gènes synthétiques $P_{32_}sd::\Delta_{sp}pedA$ et $P_{32_}leisstcda::\Delta_{sp}pedA$ comme matrice. Ces amorces permettent d'amplifier la séquence du $\Delta_{sp}pedA$ et d'ajouter un site de restriction *Nsi*I en amont du gène $\Delta_{sp}pedA$ et un site de restriction *Eco*RI quelques bases après le codon stop du gène $\Delta_{sp}pedA$.

Le gène $sp_{usp45}::\Delta_{sp}pedA$, permettant l'expression du gène codant la structure mature de la pédiocine sous le contrôle du promoteur P_{nisA} a été obtenue après 3 PCR successives. Les deux PCR PEDA1 et PEDA2 ont été réalisées en utilisant le plasmide pSec::*s-rpedA* comme matrice. Les amorces permettant d'amplifier ces produits de PCR ont été élaborées de façon à ce que l'extrémité 3' du produit de PCR PEDA1, lequel code SP_{usp45} , s'hybride avec l'extrémité 5' du produit de PCR PEDA2, lequel code $\Delta_{sp}pedA$. La PCR PEDA3 a été réalisée en utilisant les produits de PCR PEDA1 et PEDA2 comme matrice. Cette PCR permet de déléter les acides nucléiques codant le pro-peptide SD en amont de la

séquence codant la structure de la pédiocine mature, le plasmide résultant présente ainsi un gène pour lequel la séquence codant la structure de la pédiocine mature est directement fusionnée à la séquence *sp_{usp45}*.

L'ADN de la souche *Lb. plantarum* LMAX a été utilisé pour amplifier les produits de PCR PEDB et PEDC. Les produits de PCR PEDC et PEDB contiennent la séquence nucléotidique codant respectivement *pedC* et *pedB*.

Tableau 8 – Amorces et produits de PCR.

Nom des produits de PCR	Matrice	Oligonucléotides ^a	Protocole
P32SD	<i>P32_sd::Δ₁₂pedA</i>	Sens : CGTTGTAAACGACGGCCAG Anti-sens : TTCACACAGGAAACAGCTATGA	Dénaturation initiale : 94°C - 2 min 30 cycles : dénaturation 94°C - 15 s ; hybridation 50°C - 1 min ; élongation 68°C - 45 s Elongation finale : 68°C - 5 min
P32LEI	<i>P32_leisstdca::Δ₁₂pedA</i>	Sens : CGTTGTAAACGACGGCCAG Anti-sens : TTCACACAGGAAACAGCTATGA	
P32PEDA	<i>P32_Δ₁₂pedA</i>	Sens : CGTTGTAAACGACGGCCAG Anti-sens : TTCACACAGGAAACAGCTATGA	
PEDB	<i>Lb. plantarum</i> LMAX	Sens : ATCGGGATCCTAAAAAGGGAGGCCAAATATAATGAATAAGACTAAGTCGGAA Anti-sens : ATCGCTGCAGCTATTGGCTAGGCCACGT	
PCRSD	<i>P32_sd::Δ₁₂pedA</i>	Sens : CCCCCCATGCACTGATAAATATTATGGTAATGGAGTTACTTGTGGA Anti-sens : CCCCCGAATTCAGTAGTCCTTAACATTATGATTACCTTG	Dénaturation initiale : 94 °C - 2 min 15 cycles : dénaturation 94 °C - 15 s ; hybridation 50 °C - 1 min ; élongation 68 °C-45 s 15 cycles : dénaturation 94 °C - 15 s ; hybridation 55 °C - 1 min ; élongation 68 °C-45 s Elongation finale : 68 °C - 5 min
PCRLEI	<i>P32_leisstdca::Δ₁₂pedA</i>	Sens : CCCCCCATGCAATTAGAAATTTTCATCAACATGTGATGCTAAATAT Anti-sens : CCCCCGAATTCAGTAGTCCTTAACATTATGATTACCTTG	
PCRH	<i>histag::Δ₁₂pedA</i>	Sens : CCCCCCATGCACTGATCATCATCATCATCACAGCA Anti-sens : CCCCCGAATTCAGTAGTCCTTACTAGCATTATGATTACCTT	Dénaturation initiale : 94 °C - 2 min 15 cycles : dénaturation 94 °C - 15 s ; hybridation 55 °C - 1 min ; élongation 68 °C-45 s 15 cycles : dénaturation 94 °C - 15 s ; hybridation 59 °C - 1 min ; élongation 68 °C-45 s Elongation finale : 68 °C - 5 min
PEDA1	<i>pSec::s-rpedA</i>	Sens : ACAGCTCCAAGATCTAGTCTT Anti-sens : AGTAACTCCATTACCATAATATTTGCATAAACACCTGACAACGG	
PEDA2	<i>pSec::s-rpedA</i>	Sens : CCGTTGTCAGGTGTTTATGCAAAATATTATGGTAATGGAGTTACT Anti-sens : ACATGCTGAAGAGCATCTCATT	Dénaturation initiale : 94 °C - 2 min 15 cycles : dénaturation 94 °C - 15 s ; hybridation 59 °C - 1 min ; élongation 68 °C-45 s Elongation finale : 68 °C - 5 min
PEDA3	PEDA1 and PEDA2	Sens : ACAGCTCCAAGATCTAGTCTT Reverse : ACATGCTGAAGAGCATCTCATT	
PEDC	<i>Lb. plantarum</i> LMAX	Sens : GGGGGGCGATCCTAAAAAGGGAGGCCAAATATAATGTCTAAGAAATTTGGTCAAA Anti-sens : GGGGGGCTGCAGCTACTGATTATTGTAATCAGC	Dénaturation initiale : 94 °C - 2 min 15 cycles : dénaturation 94 °C - 15 s ; hybridation 52 °C - 1 min ; élongation 68 °C-45 s 15 cycles : dénaturation 94 °C - 15 s ; hybridation 55 °C - 1 min ; élongation 68 °C-45 s Elongation finale : 68 °C - 5 min

a. Les sites de restriction sont en gras.

II.2.3 Construction des plasmides

Les plasmides utilisés durant cette étude sont listés dans le tableau 9 (des schémas sont disponibles en annexe A page 125) et dérivent tous des plasmides pSec::*nucB* et pOri23. Ils ont été construits en utilisant les produits de PCR listés dans le tableau 8 et en suivant la stratégie suivante :

1. Le produit de PCR est digéré par des enzymes de restriction.
2. Le plasmide parent (pSec::*nucB* ou pOri23) est digéré par les mêmes enzymes de restriction et est dé-phosphorylé par une phosphatase d'intestin de veau (CIP ; New England Biolabs, Ipswich, USA).
3. L'insert est inséré dans le plasmide digéré et dé-phosphorylé en utilisant la ligase du phage T4 (T4 DNA ligase ; Invitrogen, Carlsbad, USA).
4. Les mélanges de ligation sont utilisés pour transformer *L. lactis* NZ9000 (excepté pour le mélange de ligation contenant le plasmide pOri::*pedB* qui a été utilisé pour transformer *E. coli* DH5 α).

Pour construire les plasmides pSec::*P₃₂-s-rpedA*, pSec::*P₃₂-l-rpedA* et pSec::*P₃₂-rpedA* à partir du plasmide pSec::*nucB*, les produits de PCR P32SD, P32LEI et P32PEDA ont été digérés par les enzymes de restriction *Bgl*II et *Eco*RI (New England Biolabs, Massachusetts, Ipswich, USA) et ont été insérés dans un plasmide pSec::*nucB* digéré par les mêmes enzymes.

Les plasmides pSec::*s-rpedA*, pSec::*l-rpedA* et pSec::*h-rpedA* ont été construits à partir du plasmide pSec::*nucB*, et des produits de PCR PCRSD, PCRLEI et PCRH. Ces produits ont été digérés par les enzymes de restriction *Nsi*I et *Eco*RI (New England Biolabs, Massachusetts, Ipswich, USA) et ont été insérés dans un plasmide pSec::*nucB* digéré par les mêmes enzymes.

Pour générer pSec::*rpedA*, le produit de PCR PEDA3 a été digéré par *Bgl*II et *Xho*I (New England Biolabs, Ipswich, USA) puis a été inséré dans un vecteur pSec::*nucB* digéré par les mêmes enzymes.

Les plasmides pOri::*pedB* et pOri::*pedC* ont été construits en utilisant le plasmide pOri23. Les produits de PCR PEDB et PEDC ont été digérés par les enzymes *Bam*HI et *Pst*I (FastDigest, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) et insérés dans un vecteur pOri23 digéré par les enzymes *Bam*HI et *Pst*I.

Tableau 9 – Plasmides utilisés

Plasmides	Description	Référence
pSec:: <i>nucB</i>	Cm^R , le gène <i>sp_{usp45}::nucB</i> est sous le contrôle du P_{nisA} , <i>repA</i> , <i>repC</i>	BERMÚDEZ-HUMARÁN <i>et al.</i> 2007
pSec:: <i>P₃₂_rpedA</i>	Cm^R , dérivé du plasmide pSec:: <i>nucB</i> portant le gène <i>sp_{usp45}::rpedA</i> permettant la sécrétion de la Rpédiocine <i>via</i> le promoteur P_{32}	Cette étude
pSec:: <i>P₃₂_s-rpedA</i>	Cm^R , dérivé du plasmide pSec:: <i>nucB</i> portant le gène <i>sp_{usp45}::s-rpedA</i> permettant la sécrétion de la S-Rpédiocine <i>via</i> le promoteur P_{32}	Cette étude
pSec:: <i>P₃₂_l-rpedA</i>	Cm^R , dérivé du plasmide pSec:: <i>nucB</i> portant le gène <i>sp_{usp45}::l-rpedA</i> permettant la sécrétion de la L-Rpédiocine <i>via</i> le promoteur P_{32}	Cette étude
pSec:: <i>rpedA</i>	Cm^R , dérivé du plasmide pSec:: <i>nucB</i> portant le gène <i>sp_{usp45}::rpedA</i> permettant la sécrétion de la Rpédiocine <i>via</i> le promoteur P_{nisA}	Cette étude
pSec:: <i>s-rpedA</i>	Cm^R , dérivé du plasmide pSec:: <i>nucB</i> portant le gène <i>sp_{usp45}::s-rpedA</i> permettant la sécrétion de la S-Rpédiocine <i>via</i> le promoteur P_{nisA}	Cette étude
pSec:: <i>l-rpedA</i>	Cm^R , dérivé du plasmide pSec:: <i>nucB</i> portant le gène <i>sp_{usp45}::l-rpedA</i> permettant la sécrétion de la L-Rpédiocine <i>via</i> le promoteur P_{nisA}	Cette étude
pSec:: <i>h-rpedA</i>	Cm^R , dérivé du plasmide pSec:: <i>nucB</i> portant le gène <i>sp_{usp45}::histag-rpedA</i> permettant la sécrétion de la H-Rpédiocine <i>via</i> le promoteur P_{nisA}	Cette étude
pOri23	<i>ermAM</i> , P_{23} , <i>repD</i> , <i>repE</i>	QUE <i>et al.</i> 2000
pOri:: <i>pedB</i>	<i>ermAM</i> , P_{23} , dérivé du plasmide pOri23 portant le gène <i>pedB</i>	Cette étude
pOri:: <i>pedC</i>	<i>ermAM</i> , P_{23} , dérivé du plasmide pOri23 portant le gène <i>pedC</i>	Cette étude

II.2.4 Préparation de bactéries compétentes et électroporation

a) *Lactococcus lactis* NZ9000

Les plasmides pOri23, pSec::*nucB*, pSec::*rpelA*, pSec::*s-rpelA*, pSec::*l-rpelA*, pSec::*h-rpelA* et pOri::*pedC* ont été clonés chez *L. lactis* NZ9000, seuls ou en combinaison par utilisation de la méthode décrite ci-dessous. Cette méthode a été adaptée de la méthode d'HOLO et NES 1989.

La souche *L. lactis* NZ9000 a été cultivée dans un bouillon M17 supplémenté avec 0,5 M de sucrose, 1% (m/v) de glycine et 0,5% (m/v) de glucose (SMGG) pendant 17 h à 30°C. Un dixième de cette culture a été utilisé pour inoculer 100 mL de SMGG, placé à 30°C jusqu'à ce que la culture atteigne une DO_{600nm} de 0,4. Après centrifugation à 5000 g pendant 5 min à 4°C, le culot a été suspendu dans 1 mL de tampon de lavage, préalablement refroidi à 4°C (0,5 M de saccharose; 10% v/v de glycérol). Cette étape de lavage a été répétée deux fois. Après le dernier lavage, le culot est re-suspendu dans 500 μ L de tampon de lavage. Les bactéries re-suspendues ont été stockées à -80°C en aliquotes de 40 μ L.

Pour l'électroporation, 40 μ L de bactéries compétentes ont été transformées avec 6 μ L de produit de ligation (dialysé contre de l'eau ultra pure pendant 15 minutes) ou de plasmide purifié. Un électroporateur Gene-Pulser (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA) a été utilisé pour délivrer un choc électrique (constante de temps 4,7 s⁻¹) en utilisant les paramètres suivants :

- 2,25 kV
- 22,5 kV/cm⁻¹
- 200 Ω
- 25 μ F

Les bactéries ont ensuite été transférées dans 4 mL de SMGMC (M17 supplémenté avec 0,5 M de sucrose, 20 mM MgCl₂ et 2 mM CaCl₂) pendant 2h à 30°C, puis étalées sur un milieu solide (0,5 M de sucrose + M17) supplémenté en antibiotique.

b) *Escherichia coli* DH5 α

La préparation de cellules compétentes *E. coli* débute par une culture de 10 mL de 17 h. Cette culture a été utilisée pour inoculer 100 mL de LB. Le milieu LB fraîchement inoculé a été placé à 37°C sous agitation (200 rpm; Amplitude : 20 mm). À DO_{600nm} de 0,6, la culture a été centrifugée à 5000 g pendant 10 minutes puis le culot lavé dans

50 mL de glycérol 10% (v/v). Cette étape est répétée 3 fois. Après le dernier lavage, le culot est re-suspendu dans 500 μL , et des aliquotes de 50 μL sont stockées à -80°C . Pour l'électroporation, 50 μL de bactéries ont été mélangés avec 5 μL de produit de ligation dans une cuvette d'électroporation (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA). Les paramètres d'électroporation utilisés sont :

- 2,5 kV
- 25 kV/cm⁻¹
- 200 Ω
- 25 μF

Les bactéries sont ensuite placées dans 1 mL de LB à 37°C pendant 1 h et les bactéries transformées ont été sélectionnées sur un milieu LB solide supplémenté avec 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'érythromycine.

c) *Carnobacterium maltaromaticum*

Une culture de 17 h de *C. maltaromaticum* a été diluée 10 fois dans 100 mL de TSBYE et placée à 30°C jusqu'à ce qu'une $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,7 soit atteinte. Les bactéries ont ensuite été centrifugées à 6000 g pendant 15 min et le culot a été lavé dans du glycérol 10% (v/v). Cette étape a été répétée 2 fois. Le culot cellulaire a ensuite été re-suspendu dans 500 μL de glycérol et les bactéries ont été conservées à -80°C en aliquotes de 50 μL . L'électroporation a été faite en utilisant un électroporateur Gene-Pulser. Cinq microlitres de plasmide ont été mélangés avec 50 μL de bactéries compétentes dans une cuvette d'électroporation. Les paramètres d'électroporation sont :

- 2,25 kV
- 22,5 kV/cm⁻¹
- 200 Ω
- 25 μF

Après l'électroporation, les bactéries ont été placées à 30°C pendant 4 h dans 4 mL de TSBYE. Les bactéries transformées ont été sélectionnées sur un milieu TSBYE solide supplémenté avec 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'érythromycine et/ou de chloramphénicol.

II.2.5 Extraction d'ADN plasmidique et génomique

a) Extraction d'ADN plasmidique chez *L. lactis*

Le protocole d'extraction de plasmide développé pour *L. lactis* a été mis au point suivant le principe décrit par O'SULLIVAN et KLAENHAMMER 1993.

Une culture de 10 mL a été centrifugée 15 min à 5000 g à température ambiante (centrifugeuse minispin Eppendorf, Hambourg, Allemagne). Le culot a été re-suspendu dans 200 µL d'une solution d'eau ultra pure contenant 25% de saccharose (m/v) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA), 30 mg/mL de lysozyme (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) et 25 µg/mL de RNase A (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA). Après une incubation de 15 minutes à 55°C, les bactéries ont été lysées en ajoutant 400 µL d'une solution contenant 3% de SDS (m/v) et 0,2 M de NaOH. Une étape de précipitation des protéines et de l'ADN chromosomique est réalisée par ajout de 300 µL d'une solution contenant 3 M d'acétate de sodium et l'échantillon est centrifugé à 11 000 g pendant 15 min pour séparer l'ADN plasmidique du précipité. Le surnageant est récolté et les ADN plasmidiques sont précipités par ajout d'un volume d'isopropanol (-20°C), puis l'échantillon est centrifugé à 11 000 g pendant 15 min. le culot est ensuite séché à 37°C pendant 30 min puis repris dans 200 µL d'eau ultra pure.

L'ADN plasmidique est ensuite purifié en utilisant le kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) en suivant les recommandations du fabricant. L'étape d'élution a été réalisée avec de l'eau ultra pure à pH = 8,5.

b) Extraction d'ADN total de la souche *Lactobacillus plantarum* LMAX

Les ADN totaux de *Lb. plantarum* LMAX ont été extraits à partir d'une culture de 10 mL. Cette culture a été centrifugée à 15 000 g pendant 15 minutes. Le culot bactérien a été re-suspendu dans 500 µL d'une solution contenant 10 mM de tris base (pH = 8) et 100 µg/ml de RNase A. Après l'ajout de 20 µL d'une solution contenant 50 mg/mL de lysozyme, l'échantillon a été incubé à 37°C pendant 40 min, puis 60 µL d'une solution contenant 0,5 M d'EDTA et 10 µL d'une solution contenant 20 mg/mL de protéinase K ont été ajoutés. Après incubation de 10 min à 37°C, 60 µL d'une solution contenant 10% de SDS (m/v, pH = 7,2) ont été ajoutés et l'échantillon a été incubé à 50°C pendant 40 min. Puis, 350 µL d'une solution contenant 5 M de potassium et 3 M d'acétate ont été ajoutés. Après séparation du précipité et du surnageant par centrifugation (15 000 g pendant 10 min), 1 mL d'isopropanol a été ajouté au surnageant pour précipiter l'ADN. L'ADN a ensuite été culoté par centrifugation à 10 000 g pendant 1 minute. Le culot a

été lavé avec 1 mL d'éthanol à 70% (v/v) et re-suspendu dans 40 µL d'eau ultra pure.

c) Extraction d'ADN plasmidique chez *E. coli*

L'ADN plasmidique d'*E. coli* a été extrait à partir d'une culture de 10 mL centrifugée 15 min à 5 000 g. Cet ADN a été isolé à partir du culot en utilisant le kit NucleoBond® (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne). L'étape d'élution a été réalisée avec de l'eau ultra pure à pH = 8,5.

II.3 Production hétérologue de la pédiocine

II.3.1 Préparation des *starters*

Une culture de 17 h a été réalisée à partir d'une colonie isolée sur milieu solide. Après 17 h, 10% de glycérol ont été ajoutés dans le milieu GM17 et des aliquotes ont été stockés à -80°C.

II.3.2 Production en flacon de 250 mL

Une aliquote de *starter* a été décongelée et utilisée pour ensemercer 20 mL de GM17. Après 17h de culture à 30°C, cette dernière a été utilisée pour ensemercer 250 mL de GM17 à une $DO_{600nm} = 0,02$ ou 0,1. La culture a été agitée à 100 rpm (Amplitude : 20 mm). Toutes les heures la DO_{600nm} a été mesurée et quand elle a atteint 0,4 la production a été induite avec 0,1 µg/mL d'une solution contenant 2,5% de nisine (m/v). Après 24 h, la culture a été arrêtée et le poids sec de 50 mL de culture a été mesuré. Le surnageant a été récolté par centrifugation à 5000 g (15 min), le pH a été ajusté à 7 avec une solution de NaOH à 4 M, et le surnageant a été stérilisé par filtration (pores de 0,22 µm). Ce dernier a été conservé à -20°C pour analyses ultérieures.

II.3.3 Production en fermenteur de 2 L

La culture a été réalisée en milieu M17 supplémenté avec 10% de glucose (m/v) selon la méthode modifiée de MIERAU *et al.* 2005 dans un milieu M17 supplémenté avec 10% de glucose (m/v) en utilisant un fermenteur de 2 L (Global Process Concept, La Rochelle, France). Les valeurs de consigne sont les suivantes (Figure 18) :

- pH = 7 ; régulé avec du NH_4OH 25% (m/v) (Sigma-Aldrich, Saint-louis, USA)

- Agitation axiale avec un mobile de type Rushton à 250 rpm
- Pourcentage d'oxygène dissous stabilisé à 5% par ajout d'air
- Température : 30°C

L'induction a été réalisée à $DO_{600nm} = 4 - 5$ avec 2 $\mu\text{g/mL}$ d'une solution contenant 2,5% de nisine (m/v). La croissance de la bactérie a été suivie toutes les heures par mesure de la DO_{600nm} . La culture est arrêtée après 24 h.

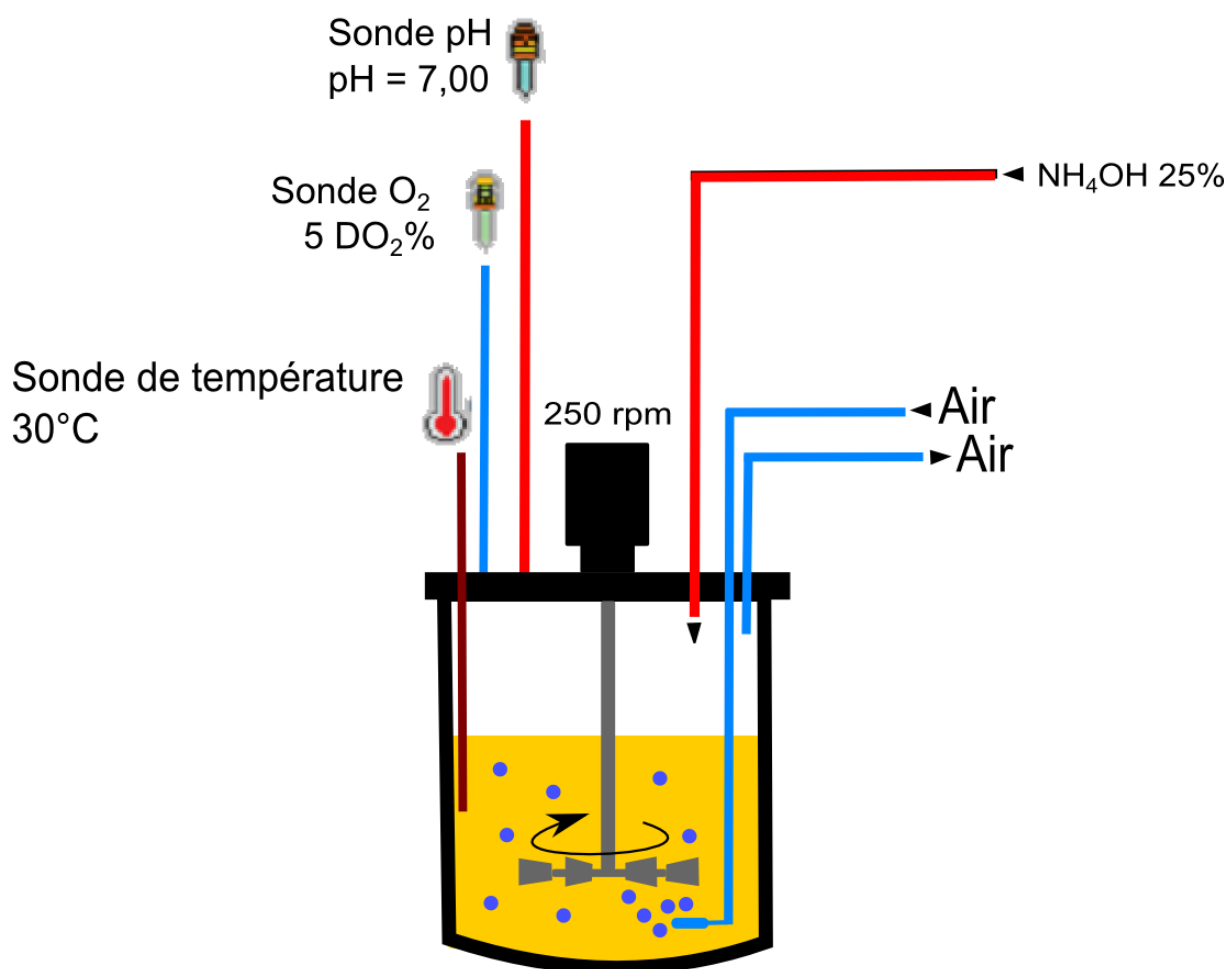


FIGURE 18 – Procédé de production en fermenteur de 2 L. Le pH, le pourcentage d'oxygène dissous et la température dans le fermenteur sont mesurés *via* des sondes. Le pH dans le fermenteur est maintenu à 7 en ajoutant une solution de NH₄OH. Le pourcentage d'oxygène dissous est stabilisé à une valeur consigne de 5% par ajout d'air. Le milieu est agité en utilisant un mobile de type Rushton à 250 rpm. La température est maintenue à une valeur consigne de 30°C.

II.4 Analyse de pédiocines recombinantes

II.4.1 ELISA

a) Anticorps primaires

Afin d'évaluer la quantité de pédiocine PA-1 produite par *L. lactis*, la méthode de dosage ELISA a été retenue. Pour ce dosage, des anticorps anti-pédiocine PA-1 ont été produits à façon par Eurogentec selon la méthode décrite par MARTÍNEZ *et al.* 1998. Dans cette méthode, un peptide correspondant à la partie C-terminale de la pédiocine PA-1 (NH₂-ATGGHQGNHKC-COOH) fusionné à la KLH (*Keyhole limpet hemocyanine* ; PH2-KLH) a été utilisé pour immuniser deux lapins selon le protocole suivant :

1. J0 : 450 mg du peptide PH2-KLH a été mélangé à l'adjuvant de Freund (à un ratio 1/1) et le mélange a été administré aux lapins par injection sous-cutanée.
2. J14 et 21 : la même dose a été administrée aux mêmes lapins par injection intramusculaire.
3. J28 : la veine marginale de l'oreille du lapin est saignée.
4. Une dose de PH2-KLH mélangée à l'adjuvant de Freund (à un ratio 1/1) est de nouveau administrée aux lapins par injection sous-cutanée aux jours 35, 45 et 56.
5. J63 : la veine marginale de l'oreille du lapin a une nouvelle fois été saignée.
6. J72 : le saignement final a été réalisé par ponction cardiaque. Le sérum a ensuite été extrait après une incubation à 4°C et une centrifugation à 1 000 g pendant 15 minutes.

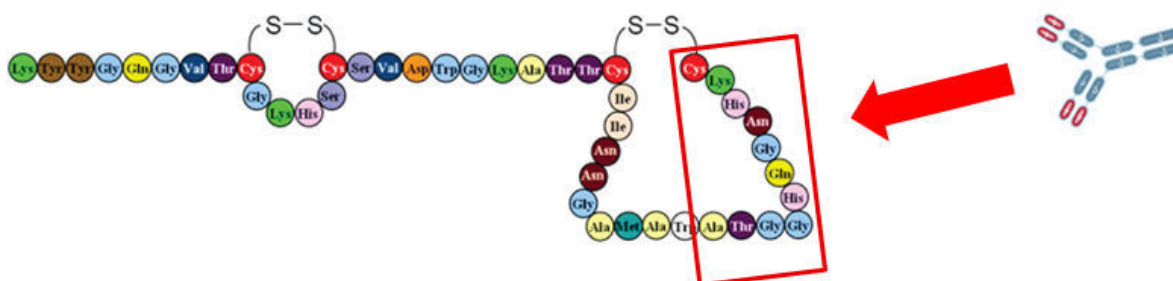


FIGURE 19 – Anticorps anti-pédiocine PA-1.

b) Protocole ELISA

Une fois les anticorps primaires anti-pédiocine PA-1 synthétisés, un protocole permettant d'évaluer la concentration des pédiocines recombinantes dans les surnageants a été mis au point. Les étapes du protocole sont décrites ci-dessous :

1. Les puits d'une microplaque 96-puits (Corning Inc., New York, USA) ont été recouverts avec 200 μL de surnageant, ou de surnageant dilué dans du tampon phosphate salin (PBS) contenant les pédiocines recombinantes, pendant une nuit à 4°C.
2. La plaque a ensuite été lavée huit fois dans un tampon de lavage constitué de PBS contenant du tween 20 à 0,05% (m/v).
3. Les puits ont été bloqués avec 300 μL de lait écrémé (10% m/v dans du PBS, Régilait, Saint-Martin-Belle-Roche, France) pendant 1 h à température ambiante.
4. La plaque a ensuite été lavée huit fois dans le même tampon de lavage PBS-Tween 0,05.
5. 150 μL d'un sérum dilué au 1/1 000 dans du PBS et contenant des anticorps anti-pédiocine polyclonaux a été ajouté dans chaque puits pendant 1 h à température ambiante.
6. Après 8 lavages, 100 μL d'une solution diluée d'anticorps secondaires de chèvre anti-IgG de lapin (1/2 000 dans du PBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) ont été ajoutés dans chaque puits. L'incubation a duré une heure à température ambiante. Ces anticorps sont couplés à une peroxydase de raifort (HRP) pour quantifier la liaison.
7. La plaque a de nouveau été lavée huit fois et 100 μL de 3,3',5,5'-tetraméthylbenzidine (TMB) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) ont été ajoutés dans chaque puits. Les anticorps secondaires liés sont détectés par l'ajout de TMB. La réaction entre le TMB et la HRP a été stoppée par ajout de 100 μL de H_2SO_4 à 2N. L'absorbance dans chaque puits est lue à 450 nm.

La courbe étalon a été réalisée avec de la pédiocine PA-1 purifiée provenant de *Pediococcus acidilactici* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) diluée dans du PBS. Les concentrations en dérivés recombinants de la pédiocine ont été déterminées en se référant à cette courbe étalon (Figure 20).

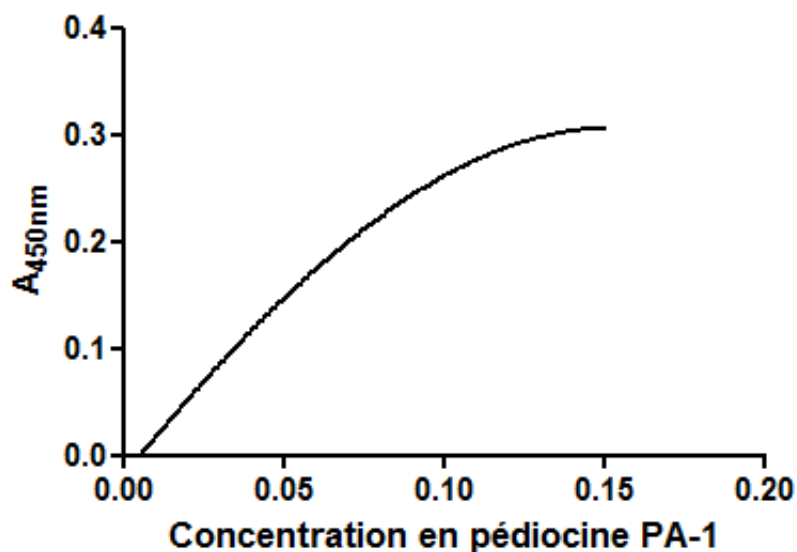


FIGURE 20 – Exemple de courbe étalon utilisée pour doser les dérivés recombinants de la pédiocine.

II.4.2 Dosage de l'activité antibactérienne par diffusion en milieu gélosé

La concentration minimale inhibitrice (CMI) de chacun des surnageants contenant les dérivés recombinants de la pédiocine a été déterminée en utilisant la méthode décrite par MATHIEU *et al.* 1993.

Des milieux de culture permettant une croissance optimale de la souche cible ont été gélifiés par l'addition de 12 g.L⁻¹ d'agar (Biokar). Le milieu en surfusion a été ensemencé avec la souche cible, préalablement repiquée deux fois afin d'avoir une $DO_{600nm} = 0,01$, puis 12 mL de milieu ont été coulés en boîtes de Petri et mis à 4°C pendant 30 min. Des puits ont été creusés dans la gélose à l'aide d'une cloche de Durham stérile de 5 mm de diamètre. A partir d'une solution de concentration connue, des dilutions au 1/2 ont été réalisées dans de l'eau ultra pure. Un volume de 25 µL d'échantillon a été déposé dans chaque puits. Les milieux ont été incubés une nuit à 4°C, puis mis à la température optimale de croissance de la souche cible pendant au moins 10 h. La présence d'une zone d'inhibition est notée et son diamètre mesurée. Les essais ont été réalisés en triplicat. La CMI est déterminée comme étant la dernière dilution entraînant l'inhibition de la souche cible.

II.4.3 tricine-SDS-PAGE et gel d'activité

a) Précipitation au sulfate d'ammonium

Pour les analyses sur gel de polyacrylamide et en spectrométrie de masse, les protéines du surnageants ont été précipités et concentrés au sulfate d'ammonium. L'avantage de la précipitation au sulfate d'ammonium est qu'elle permet une précipitation différentielle suivant le pI de la protéine. Cette précipitation permet d'éliminer les composants des surnageants pouvant gêner la détection au bleu de Coomassie.

La concentration en sulfate d'ammonium dans les surnageants est portée à 40% (m/v), puis ils sont incubés à 4°C pendant une heure. Ils sont ensuite centrifugés et solubilisés dans de l'eau ultra pure.

b) Gel de tricine-SDS-PAGE

Les protéines des surnageants ont été précipités au sulfate d'ammonium et les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium et de tricine (tricine-SDS-PAGE) en suivant la méthode décrite par Schagger (SCHÄGGER 2006). Deux gels contenant 11% d'acrylamide (m/v) ont été réalisés. A la fin de l'électrophorèse, le premier gel a été coloré en utilisant une solution contenant du bleu de Coomassie. L'autre gel a été lavé 3 fois dans une solution d'eau ultra pure pendant 30 min puis a été placé sur une boîte de Petri et recouvert d'un milieu en surfusion inoculé avec *C. maltaromaticum* DSM20730_pSec::nucB à une $DO_{600nm} = 0,01$. La boîte a ensuite été placée à 30°C pendant 17 h et la présence de zone d'inhibition de croissance de la souche indicatrice a été recherchée.

II.4.4 Spectrométrie de masse par MALDI-TOF

Les analyses de masse ont été réalisées en utilisant un spectromètre de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice et un analyseur à temps de vol (MALDI-TOF) à Nantes par la Plate-forme BIBS (Biopolymères, Biologie Structurale ; Rue de la Géraudière - BP 71627, 44316 Nantes cedex 3, France).

Pour analyser le statut des ponts disulfures, deux bandes correspondant à la protéine d'intérêt sur gel de tricine-SDS-PAGE ont été découpées et ont subi un traitement tryptique. L'une des bandes a subi une d'alkylation en utilisant de l'iodoacétamide et l'autre a d'abord été réduite préalablement à l'alkylation. Cette deuxième bande sert de témoin. Les peptides tryptiques sont extraits en utilisant une solution contenant 2% d'acétoni-

trile (v/v) et 0,04% d'acide trifluoroacétique (v/v) puis l'analyse a été conduite selon la méthode standard de l'analyse de masse totale.

II.5 Purification sur colonne IMAC

II.5.1 Préparation des échantillons et des tampons

Pour que la H-Rpédiocine puisse être purifiée par *immobilized-metal affinity Chromatography* (IMAC), 100 mL de surnageant ont été équilibrés en imidazole par l'ajout de 2 mmol d'imidazole. Un tampon comprenant 20 mM d'imidazole (pH = 7,4) a été réalisé pour permettre le lavage de la colonne. Le tampon d'élution a lui été fait à 250 mM d'imidazole.

II.5.2 Purification de la H-Rpédiocine par IMAC en utilisant un système de chromatographie basse pression

100 mL de surnageant contenant la H-Rpédiocine ont été filtrés sur membrane en acétate de cellulose 0,22 μm (Millipore, Molsheim, France) et déposés sur une colonne IMAC de 1 mL (GE Healthcare Life-Science, Orsay, France). L'élution a été réalisée à un débit de 1 mL.min⁻¹ avec un système de chromatographie basse pression ÄKTA (GE Healthcare Life-Science, Orsay, France). La détection des composés de l'extrait a été réalisée en ligne à l'aide d'un détecteur ultraviolet à 214 nm et 280 nm.

II.6 Analyse de séquences

Les séquences d'acides nucléiques ont été analysées en utilisant les algorithmes BLAST (ALTSCHUL *et al.* 1997), SignalP (NIELSEN *et al.* 1997), Interproscan (QUEVILLON *et al.* 2005)). Les séquences des protéines PedA (accession number : P29430), PedB (accession number : P36496), PedC (accession number : P37249), PedD (accession number : P36497), BdbA (accession number : P68569), PlaC (accession number : Q93FV5), SkgC (accession number : B2LS01), CoaC (accession number : Q9EZB1) et BlpG_{st} (accession number : Q03J39), proviennent d'Uniprot (UNIPROT CONSORTIUM 2014).

Chapitre III

Résultats

III.1 Mise au point d'un système d'expression hétérologue permettant la production de pédiocines recombinantes

III.1.1 Introduction

L'expression hétérologue de la pédiocine nécessite :

1. une bactérie hôte,
2. un vecteur d'expression présentant tous les signaux nécessaires à l'expression (système d'expression hétérologue) et à l'export de protéines recombinantes.

III.1.2 Choix de l'hôte : *Lactococcus lactis*

Lactococcus lactis et *E. coli* sont les deux hôtes les plus utilisés pour la production de bactériocines recombinantes. Cependant, la sécrétion directement dans le surnageant d'une pédiocine PA-1 recombinante par *E. coli* est complexe et nécessite l'utilisation d'une souche mutante dépourvue de membrane externe (MILLER *et al.* 1998b). *Lactococcus lactis* étant une bactérie gram positive, celle-ci ne possède pas de membrane externe, la sécrétion *via* le système Sec ne nécessite donc que l'ajout d'un peptide signal (LI *et al.* 2011 ; MARTÍN *et al.* 2007a). C'est une bactérie couramment utilisée pour la production hétérologue et la sécrétion de bactériocines recombinantes, dont des pédiocines recombinantes. C'est pourquoi, elle a été choisie comme hôte de production hétérologue.

Durant cette thèse, la production de pédiocine PA-1 par *C. maltaromaticum* DSM20730 a aussi été évaluée. Les résultats sont présentés dans la section III.4 (page 108).

III.1.3 Choix d'un peptide signal permettant la sécrétion de la pédiocine recombinante Rpédiocine *via* le système Sec de *L. lactis*

Plusieurs peptides signaux (SP_{EntP}, SP_{Usp45} et SP_{IlirJM79}), permettant la sécrétion *via* le système Sec, ont déjà été utilisés pour sécréter des bactériocines recombinantes chez *L. lactis* (BARRERO *et al.* 2011a; JIMÉNEZ *et al.* 2013). Les résultats de ces études montrent que le peptide SP_{Usp45} apparaît plus efficace pour la sécrétion de bactériocines recombinantes chez *L. lactis*. De plus, SP_{Usp45} a déjà été mis en œuvre pour sécréter la pédiocine PA-1 chez cette bactérie (LI *et al.* 2011). C'est pourquoi, il a été choisi pour sécréter les dérivés recombinants de la pédiocine *via* le système Sec de *L. lactis*.

III.1.4 Choix d'un système d'expression

Deux systèmes d'expression ont été évalués : un premier incluant l'utilisation d'un promoteur constitutif et un autre impliquant l'utilisation d'un promoteur inductible.

P₃₂
AGATTAATAGTTTTAGCTATTAATCTTTTTTATTTTTATTTAAGAATGGCTTA
ATAAAGCGGTTACTTTGGATTTTTGTGAGCTTGGAC**TAGAAAAAA**ACTTCACAA
AATG**CTATACT**AGGTAAGTAAAAAATATTC**GGAGGA**AATAATTTTGAAATG

P₂₃
TCGAAAAGCCCTGACAACCCTCGTTCCTAAAAAGGAATAAGCGTTTGGTCAGTA
AATAATAGAAATAAAAAATCAGACCTAAGACTG**ATGACAAAA**AGAGCAAATTTTG
ATAAAATAGTATTAGGAATTAAATTAA**AAAGGGAGG**CCAAATATAATG

P_{nisa}
ATAAACGGCT**CTGATT**AATTTCTGAAGTTTGTTAGAT**TACAAT**GATTT**CGTT**CGAAG
GAACACAAAATAAATTAT**AAGGAGG**CACTCAAAATG

FIGURE 21 – Promoteurs testés pour l'expression hétérologue de gènes chez *L. lactis* NZ9000. Les boîtes -35 sont en rouge, les boîtes -10 en vert, les séquences Shine-Dalgarno en bleu, les séquences en italique indiquent le point de départ de la transcription et les nucléotides en gras indiquent le codon initiateur de la traduction

a) Promoteur constitutif

Le promoteur P₃₂ (Figure 21 ; VOSSEN *et al.* 1987) a été le plus utilisé pour l'expression hétérologue de bactériocines (BORRERO *et al.* 2011a,b ; JIMÉNEZ *et al.* 2013 ; SÁNCHEZ *et al.* 2008). Durant ces travaux de thèse, plusieurs tentatives de clonage ont été réalisées en vue de produire des dérivés recombinants de la pédiocine sous le contrôle du promoteur P₃₂. Aucun transformant n'a été obtenu chez *L. lactis*.

b) Promoteur inductible : système NICE

Il a été décidé d'utiliser un système d'expression impliquant l'utilisation d'un promoteur inductible. L'inductibilité du système permettra de découpler la phase de croissance de la phase de production et ainsi de limiter les problèmes de toxicité éventuels. Le promoteur inductible retenu est le promoteur P_{nisA} (Figure 21). Ce promoteur fait partie du système NICE dont le fonctionnement a été détaillé dans la revue bibliographique (Figure 13 ; page 37). Dans le cadre de cette étude, l'inconvénient majeur de ce promoteur est que l'induction est assurée par la nisine, une bactériocine de classe I. Il était donc possible que la nisine interfère avec les résultats des tests d'activité antibactérienne. Le premier élément en défaveur de cette hypothèse est que le système NICE est inductible à des concentrations sub-inhibitrices de nisine. En outre, afin de garantir l'absence de biais, les tests d'activité antibactérienne ont été réalisés en incluant une souche productrice témoin, la souche *L. lactis* NZ9000_pSec::nucB. Cette souche a été cultivée dans les mêmes conditions que les souches produisant les dérivés recombinants de la pédiocine. Elle produit la nucléase B de *Staphylococcus aureus* qui ne présente pas, à notre connaissance, d'activité antibactérienne.

III.1.5 Choix du vecteur d'expression

Il est décrit que la divercine RV41 peut être produite chez *L. lactis* sous le contrôle du promoteur P_{nisA} et sécrétée *via* le système Sec en insérant le gène codant la structure mature de la divercine RV41 dans le plasmide pSec::nucB à la place du gène *nucB* (BERMÚDEZ-HUMARÁN *et al.* 2007). Ce même plasmide a été utilisé pour produire des dérivés recombinants de la pédiocine chez *L. Lactis* NZ9000.

III.1.6 Construction d'une souche permettant la sécrétion d'une pédiocine recombinante *via* le système Sec de *L. Lactis* NZ9000

pSec::rpedA

pSec::rpedA (séquençage)	TTAATTCATCTTGAGAAAGTATTGGTAATAATATTATTGTCGATAACGCCGAGCATAATAACCGGCTCTGATTAAATTCGAAATTTGTTAGATACAATG
pSec::rpedA (théorique)	-----GAGCATAATAACCGGCTCTGATTAAATTCGAAATTTGTTAGATACAATG
pSec::rpedA (séquençage)	ATTTCGTTGGAAGGAACACAAAATAAATTAAGGAGGCCACTCAAAATGAGTACAAAAGATTTAACTTGGATTGGTATCTGTTTCGAAGAAAGATTC
pSec::rpedA (théorique)	ATTTCGTTGGAAGGAACACAAAATAAATTAAGGAGGCCACTCAAAATGAGTACAAAAGATTTAACTTGGATTGGTATCTGTTTCGAAGAAAGATTC
pSec::rpedA (séquençage)	AGGTGCATCACACGCATTACAAGTATTTCGCTATGTACACCCGGTTGTAAAAACAGGAGACTCTGCATGGATCCCCGCTGGAACGAACTTAATGGGAGG
pSec::rpedA (théorique)	AGGTGCATCACACGCATTACAAGTATTTCGCTATGTACACCCGGTTGTAAAAACAGGAGACTCTGCATGGATCCCCGCTGGAACGAACTTAATGGGAGG
pSec::rpedA (séquençage)	AAAAATTAAAAAGAACAGTTATGAAAAAAAGATATCTCAGCTATTTTAAATGCTACAGTGA TACTTCTGCTGCAGCCCCGTTGT CAGGT GTTTATG
pSec::rpedA (théorique)	AAAAATTAAAAAGAACAGTTATGAAAAAAAGATATCTCAGCTATTTTAAATGCTACAGTGA TACTTCTGCTGCAGCCCCGTTGT CAGGT GTTTATG
pSec::rpedA (séquençage)	CAAAATATTATGGTAA TGGAGTTACTTGTGGAAAA CATTCA TGTCTGTTGATTGGGTAAAGCTACA ACTTGTATTATTAATAATGGAGCTATGGCATG
pSec::rpedA (théorique)	CAAAATATTATGGTAA TGGAGTTACTTGTGGAAAA CATTCA TGTCTGTTGATTGGGTAAAGCTACA ACTTGTATTATTAATAATGGAGCTATGGCATG
pSec::rpedA (séquençage)	GGCTACTGGTGACATCAAGGTAATCATAAA TGTAA GGACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACGGTATCGATAGCCCGCTTAATGAGCGGGC
pSec::rpedA (théorique)	GGCTACTGGTGACATCAAGGTAATCATAAA TGTAA GGACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACGGTATCGATAGCCCGCTTAATGAGCGGGC
pSec::rpedA (séquençage)	TTTTTTTGTATCAAGCTTATCGATACCGTGCACCTGAGTGCATATTTTCGGCAATCTTCTCAATGAGATGCTCTTCAGCATGTTCAANGATGTCGAT
pSec::rpedA (théorique)	TTTTTTTGTAT-----

FIGURE 22 – Conformité de la séquence de l'insert du plasmide pSec::rpedA.

La boîte -35 est indiquée en caractères rouge, la boîte -10 en caractères vert et la séquence Shine-Dalgarno en caractères bleu. La séquence codant le peptide signal de la protéine Usp45 est surlignée en vert, la séquence codant la structure mature de la pédiocine est surlignée en rouge et la séquence comprenant un terminateur de transcription est surlignée en gris.

La bactérie *L. lactis* NZ9000 n'ayant jamais été transformée auparavant au laboratoire, une mise au point préalable a été nécessaire. Le protocole obtenu est basé sur les travaux de HOLO et NES 1989 et permet d'atteindre une efficacité de $2,3 \cdot 10^5$ transformants/ μ g d'ADN lorsque la souche *L. lactis* NZ9000 et le plasmide pGH9 sont utilisés.

Le plasmide pSec::rpedA a été construit afin de permettre la production de la pédiocine PA-1 recombinante par *L. lactis*. La séquence nucléotidique codant le peptide SP_{Usp45} est directement fusionnée à la séquence codant le gène $\Delta_{sp}pedA$ (figure 23A) en 5'. Le plasmide pSec::rpedA permet ainsi, en théorie, après clivage du peptide signal, la sécrétion d'une protéine ayant la structure mature de la pédiocine PA-1 (Rpédiocine).

L'insert du plasmide pSec::rpedA obtenu a été vérifié par séquençage. La comparaison de cette séquence avec la séquence théorique montre que la séquence clonée est conforme (Figure 22).

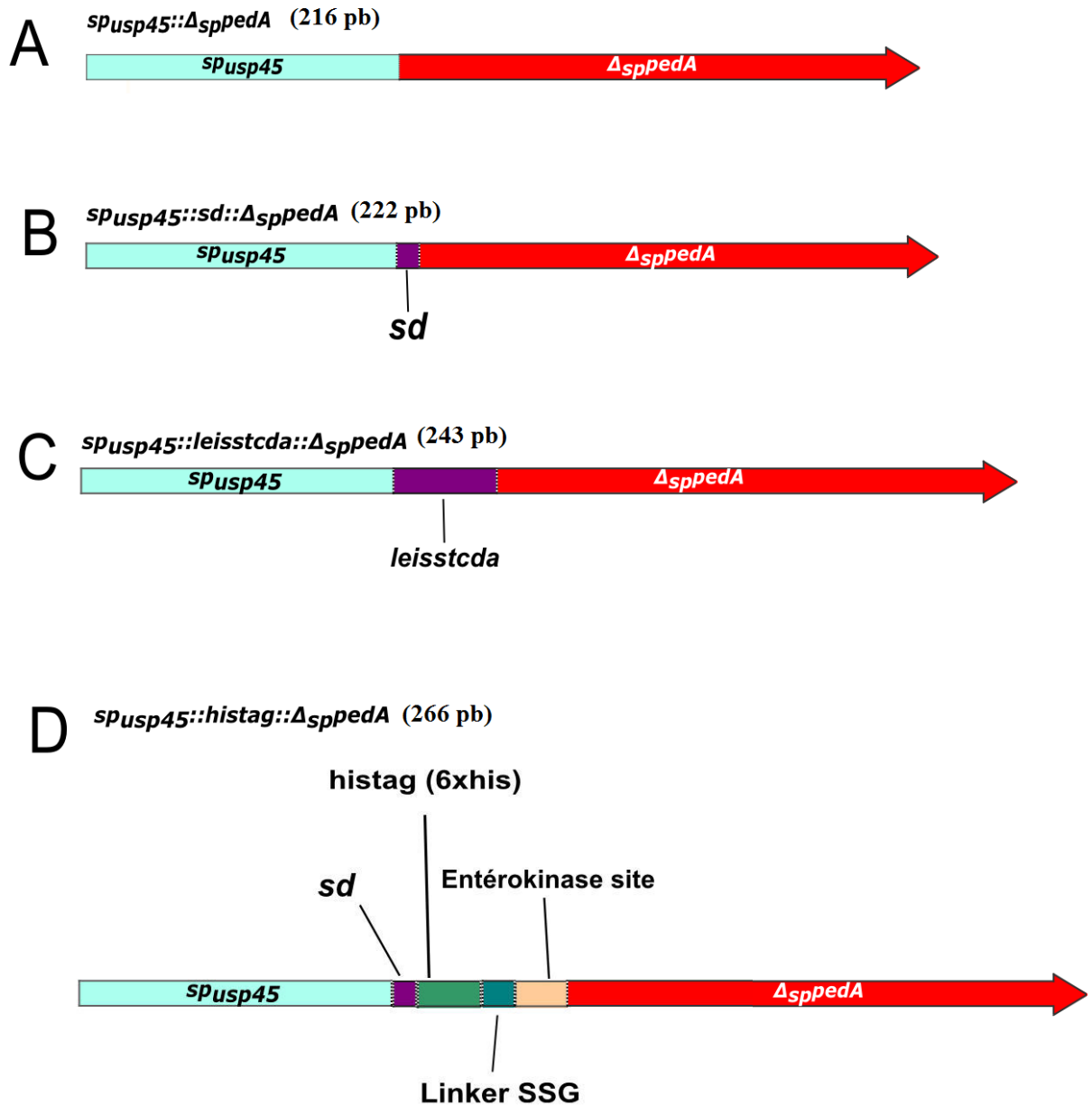


FIGURE 23 – Gènes codant les dérivés de la pédiocine. Le gène codant $\Delta_{sp}pedA$ est fusionné en 5' à la séquence nucléotidique codant le peptide signal de la protéine Usp45 (*sp_{usp45}*). Après sécrétion, il est attendu que le peptide signal soit clivé et que la séquence mature de la pédiocine PA-1 (Rpédiocine) soit sécrétée (A). La séquence codant le pro-peptide SD (B) ou le pro-peptide LEISSTCDA (C) a été insérée entre la séquence codant *sp_{usp45}* et $\Delta_{sp}pedA$. Structure du gène synthétique *histag::Δ_{sp}pedA* (D). Le gène $\Delta_{sp}pedA$ est en rouge. La séquence nucléotidique en saumon code un site de coupure à l'entérokinase. La séquence nucléotidique en bleu code une charnière. La séquence nucléotidique de couleur émeraude code une étiquette histidine (6xhis ; histag). La séquence nucléotidique en violet code le pro-peptide SD. En bleu clair la séquence codant le signal peptide de la protéine Usp45.

III.1.7 Choix d'une souche indicatrice permettant d'évaluer la production des dérivés de la pédiocine

Les deux souches *C. maltaromaticum* DSM20730 et *L. monocytogenes* EGDe *lux* ont principalement été utilisées pour révéler les activités antibactériennes des dérivés de la pédiocine. La souche *L. monocytogenes* EGDe *lux* a été utilisée pour déterminer empiriquement la concentration de nisine à utiliser pour induire le système NICE. L'intérêt de cette souche est qu'elle est résistante au chloramphénicol et permet donc de tester des surnageants de *L. lactis* transformés avec des dérivés du plasmide pSec::*nucB*. Ce plasmide porte en effet une cassette de résistance au chloramphénicol et doit être maintenu en présence de cet antibiotique.

Par la suite, seule *C. maltaromaticum* a été utilisée comme souche cible. En effet, une souche indicatrice résistante aux deux antibiotiques chloramphénicol et érythromycine était nécessaire puisque certaines souches de *L. lactis* ont été transformées avec des dérivées de deux plasmides pSec::*nucB* et pOri23 (ce dernier portant une cassette de résistance à l'érythromycine). Étant donné que le laboratoire ne présente pas d'agrément pour transformer la bactérie *L. monocytogenes*, la bactérie *C. maltaromaticum* a été choisie. La souche *C. maltaromaticum* DSM20730 a ainsi été transformée avec les plasmides pSec::*nucB* et pOri23 et la souche obtenue a été utilisée comme souche indicatrice pour tester des surnageants de *L. lactis*, contenant de l'érythromycine et du chloramphénicol, susceptibles de produire des dérivés recombinants de pédiocine.

a) Construction de la souche indicatrice

La transformation de *C. maltaromaticum* avec les plasmides pSec::*nucB* et pOri23 a nécessité un protocole de préparation de bactéries compétentes et d'électroporation. Quatre souches de *C. maltaromaticum*, DSM20730, F2, F88 et CIP101342, ont été testées pour leur capacité à être transformées génétiquement en utilisant le plasmide pSec::*nucB*. Deux préparations du même plasmide ont été utilisées : une provenant d'*E. coli* DH5 α et l'autre de *L. lactis* NZ9000, pour transformer les quatre souches. Aucun transformant n'a été obtenu avec le plasmide provenant d'*E. coli*. Avec *L. Lactis*, 50 ng/mL de pSec::*nucB* ont été suffisants pour la transformation des quatre souches. Pour la suite, la souche *C. maltaromaticum* DSM20730_pSec::*nucB* a été choisie et transformée avec le plasmide pOri23. La souche résultante (*i. e.* *C. maltaromaticum* DSM20730_pSec::*nucB*_pOri23) résistante à la fois à l'érythromycine et au chloramphénicol, a été utilisée pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices CMI des dérivés de la pédiocine.

b) Construction d'une souche résistante aux dérivés de la pédiocine.

Afin de valider que les activités antibactériennes observées étaient bien dues à une activité de type pédiocine, un plasmide permettant l'expression de la protéine d'immunité de la pédiocine PA-1 a été construit et utilisé pour transformer la souche *C. maltaromaticum* DSM20730_pSec::nucB. Dans ce plasmide, le gène codant la protéine d'immunité de la pédiocine PA-1 (*pedB*) est sous le contrôle du promoteur constitutif P₂₃ (Figure 21). Avant de transformer la souche avec ce plasmide, l'insert a été séquencé pour s'assurer qu'aucune mutation ne s'était produite pendant la construction du plasmide. Les tests d'activité sur gélose montrent que la souche *C. maltaromaticum* DSM20730_pSec::nucB_pOri::pedB est résistante à la pédiocine, tandis que la souche *C. maltaromaticum* DSM20730_pSec::nucB_pOri23 transformée avec le vecteur parent (pOri23) est sensible (Figure 25 ; page 91).

III.1.8 Condition optimale d'induction de la production de Rpédiocine par *L. lactis* NZ9000_pSec::rpedA

Les conditions optimales d'induction du système NICE ont été déterminées en testant différentes concentrations en nisine (de 25 à 2000 ng/mL), en utilisant la souche *L. lactis* NZ9000_pSec::rpedA, et la souche *L. monocytogenes* EGDe lux comme souche indicatrice (Figure 24). La concentration optimale d'induction a été définie comme la concentration permettant de produire l'activité antibactérienne la plus importante. De plus, étant donné que la nisine est une bactériocine, il était nécessaire de s'assurer que la concentration d'induction optimale soit inférieure à la CMI des souches indicatrices choisies.

Il a été déterminé qu'une concentration de 0,1 µg/mL permet de produire l'activité la plus importante vis-à-vis de la souche *L. monocytogenes* EGDe lux (Figure 24). Par ailleurs, la CMI mesurée est de 31 µg/L pour les souches indicatrices *L. monocytogenes* EGDe lux et *C. maltaromaticum* DSM20730_pSec::nucB_pOri23. La CMI de ces souches est donc 310 fois supérieure à la concentration optimale d'induction. Compte tenu que cette concentration d'induction (0,1 µg/mL) permet de produire le plus d'activité et qu'elle est sub-inhibitrice, celle-ci a été retenue pour la suite de l'étude.

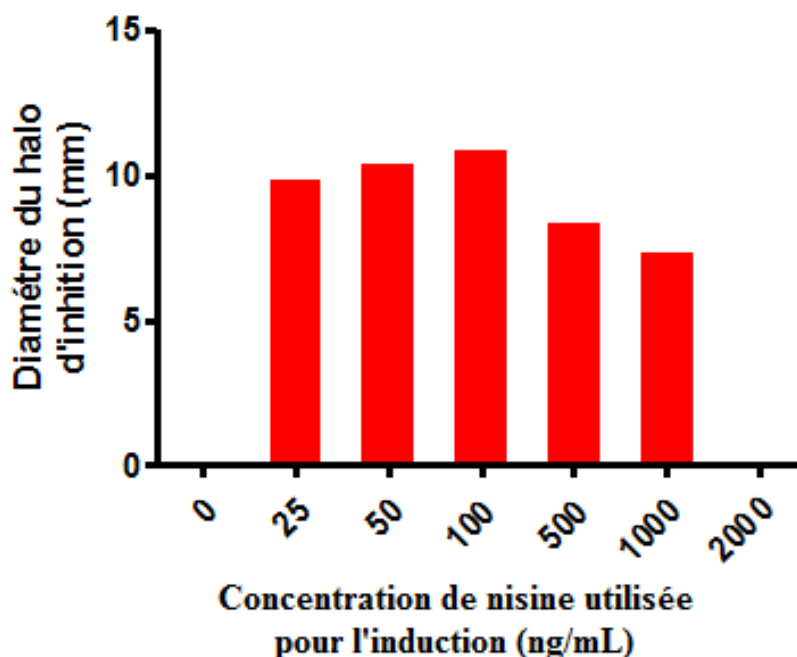


FIGURE 24 – Concentration optimale de nisine permettant une production optimale de dérivés recombinants de la pédiocine chez *L. lactis* via le système NICE.

III.2 Optimisation de la sécrétion de la pédiocine recombinante chez *L. lactis* par greffage de peptide

III.2.1 Impact des pro-peptides SD et LEISSTCDA sur la sécrétion de pédiocines recombinantes

a) Clonage des dérivés de la pédiocine S-Rpédiocine et L-Rpédiocine

Les gènes codant les dérivés de la pédiocine *sd::Δ_{sp}pedA* et *leisstcda::Δ_{sp}pedA* sont détaillés en figure 23A et B. Pour ces deux gènes, les séquences nucléotidiques codant les pro-peptides SD et LEISSTCDA ont été insérés entre la séquence *sp_{usp45}* et celle codant la pédiocine. Ces gènes ont été clonés dans le plasmide pSec::*nucB* pour former les plasmides pSec::*s-rpedA* et pSec::*l-rpedA*. Ces plasmides permettent, en théorie, après clivage du peptide signal, la sécrétion des dérivés de la pédiocine nommés S-Rpédiocine (issu de pSec::*s-rpedA*) et L-Rpédiocine (issus de pSec::*l-rpedA*) pour lesquels les pro-peptides SD et LEISSTCDA sont fusionnés à la pédiocine recombinante du côté N-terminal. Les deux plasmides ont été obtenus par transformation *L. lactis* NZ9000. Ils ont ensuite

été extraits et leur insert a été séquencé afin de vérifier leur intégrité par rapport à la séquence attendue. Les résultats du séquençage ont permis de démontrer qu'aucune mutation n'avait eu lieu durant le clonage.

b) Production en flacon de 250 mL des pédiocines recombinantes

Les bactéries productrices de pédiocines recombinantes (Rpédiocine, S-Rpédiocine et L-Rpédiocine) ont été cultivées en condition d'induction afin d'évaluer l'impact des peptides SD et LEISSTCDA sur la productivité. La production des pédiocines Rpédiocine, S-Rpédiocine et L-Rpédiocine par *L. lactis* a été évaluée comme décrit dans le chapitre matériel et méthodes (Page 61).

Afin de déterminer si la production des dérivés de la pédiocine pouvait avoir un impact sur la croissance, le poids sec, le taux de croissance maximum spécifique ($\mu_{\max}$) et la DO_{600nm} finale ont été mesurés pour chaque souche productrice (Tableau 10). En fin de culture, ces paramètres pour les souches *L. lactis* NZ9000_pSec::nucB, *L. lactis* NZ9000_pSec::rpedA, *L. lactis* NZ9000_pSec::s-rpedA, et *L. lactis* NZ9000_pSec::l-rpedA sont similaires, indiquant que les souches croissent de la même façon dans ces conditions de culture (Tableau 10).

Tableau 10 – Croissance des souches produisant les pédiocines recombinantes

Souche productrice	DO_{600nm} finale ^a	$\mu_{\max}$ ^{a,b}	Poids sec ^{a,c}
<i>L. lactis</i> NZ9000_pSec::nucB	2,3 ± 0,1 ^d	0,80 ± 0,05 ^d	0,32 ± 0,02
<i>L. lactis</i> ML3	2,6 ± 0,1 ^{e,f}	0,63 ± 0,01 ^{e,f}	0,33 ± 0,03
<i>L. lactis</i> NZ9000_pSec::rpedA	2,2 ± 0,1 ^d	0,80 ± 0,05 ^d	0,33 ± 0,01
<i>L. lactis</i> NZ9000_pSec::s-rpedA	2,2 ± 0,1 ^d	0,80 ± 0,04 ^d	0,33 ± 0,01
<i>L. lactis</i> NZ9000_pSec::l-rpedA	2,3 ± 0,1 ^d	0,82 ± 0,01 ^d	0,33 ± 0,01

a. moyenne de trois répétitions biologiques ± écart type

b. Taux de croissance spécifique exprimé en h^{-1}

c. Poids sec exprimé en g/l/ DO_{600nm}

d. différence significative par rapport au surnageant de la souche *L. lactis* ML3

(*t*-test ; *p*-value < 0,05)

e. différence significative par rapport au surnageant de la souche *L. lactis* NZ9000_pSec::nucB

(*t*-test ; *p*-value < 0,05)

f. différence significative par rapport au surnageant de la souche *L. lactis* NZ9000_pSec::rpedA

(*t*-test ; *p*-value < 0,05)

Afin d'évaluer la productivité spécifique des dérivés de la pédiocine un dosage ELISA indirect a été mis au point. Cette méthode a été utilisée pour doser ces dérivés dans les surnageants de culture des souches *L. lactis* NZ9000_pSec::rpedA, *L. lactis* NZ9000_pSec::s-

rpda et *L. lactis* NZ9000_pSec::*l-rpda*. Les résultats montrent que les surnageants des souches *L. lactis* NZ9000_pSec::*rpda*, *L. lactis* NZ9000_pSec::*s-rpda* produisent approximativement 2,3 μM et que la souche *L. lactis* NZ9000_pSec::*rpda* produit approximativement 1,5 μM de dérivés recombinants de la pédiocine.

La productivité des souches *L. lactis* NZ9000_pSec::*rpda*, *L. lactis* NZ9000_pSec::*s-rpda* et *L. lactis* NZ9000_pSec::*l-rpda* a été calculée en normalisant la concentration de pédiocine dosée dans le surnageant par le poids sec de la bactérie. Il a été déterminé que les pro-peptides SD et LEISSTCDA permettaient d'augmenter la productivité globale de pédiocines recombinantes d'un facteur 1,5 chez *L. lactis* (Tableau 11).

Tableau 11 – Production des dérivés de pédiocines

Souche productrice	Produit	Productivité spécifique ^{a,b}
<i>L. lactis</i> ML3	ML3-Rpédiocine	< 0,44
<i>L. lactis</i> NZ9000_pSec:: <i>rpda</i>	Rpédiocine	2,25 $\pm$ 0,39
<i>L. lactis</i> NZ9000_pSec:: <i>s-rpda</i>	S-Rpédiocine	3,49 $\pm$ 0,16 ^c
<i>L. lactis</i> NZ9000_pSec:: <i>l-rpda</i>	L-Rpédiocine	3,22 $\pm$ 0,25 ^c

a. Productivité spécifique exprimée en μmol équivalent pédiocine PA-1/g de bactéries

b. moyenne de trois répétitions biologiques $\pm$ écart type

c. différence significative par rapport au surnageant de la souche *L. lactis* NZ9000_pSec::*rpda* (*t*-test ; *p*-value < 0,05)

III.2.2 Conséquences des peptides SD et LEISSTCDA sur l'activité antibactérienne

a) Test d'activité sur gélose

L'activité des surnageants des souches produisant les dérivés de la pédiocine Rpédiocine, la S-Rpédiocine et la L-Rpédiocine a été évaluée par la méthode des puits en gélose en utilisant les souches *C. maltaromaticum* DSM20730_pSec::*nucB*_pOri23 (Figure 25A) et *C. maltaromaticum* DSM20730_pSec::*nucB*_pOri::*pedB* (Figure 25B) comme souches indicatrices. Des zones d'inhibition ont été obtenues pour les surnageants des souches *L. lactis* NZ9000_pSec::*s-rpda*, *L. lactis* NZ9000_pSec::*l-rpda*, et *L. lactis* NZ9000_pSec::*rpda* (Figure 25A, colonne 1, 2, 3 et 4). Aucune zone d'inhibition n'a été observée pour le surnageant de la souche contrôle *L. lactis* NZ9000_pSec::*nucB* (Figure 25A, colonne 5). De plus, quelle que soit la souche testée, aucune zone d'inhibition n'a été obtenue en utilisant la souche *C. maltaromaticum* DSM20730_pSec::*nucB*_pOri::*pedB*

transformée avec le gène produisant la protéine d'immunité de la pédiocine PA-1 comme souche indicatrice (Figure 25B). Ces tests d'activité montrent que les souches *L. lactis* NZ9000_pSec::s-rpedA, *L. lactis* NZ9000_pSec::l-rpedA et *L. lactis* NZ9000_pSec::rpedA permettent de produire des dérivés actifs de la pédiocine.

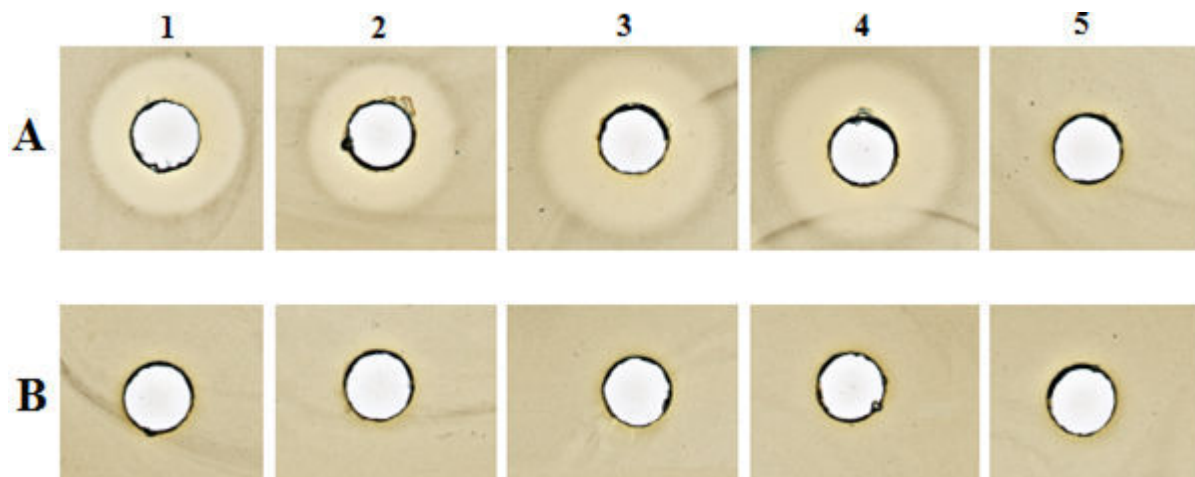


FIGURE 25 – Activité antibactérienne des dérivés recombinants de la pédiocine. L'activité des surnageants des souches productrices a été évaluée en utilisant la méthode des puits en gélose et en utilisant la souche indicatrice *C. maltaromaticum* DSM20730_pSec::nucB_pOri23 (ligne A) ou la souche résistante à la pédiocine *C. maltaromaticum* DSM20730_pSec::nucB_pOri::pedB (ligne B). Les colonnes 1, 2, 3, 4 et 5 montrent respectivement l'activité antimicrobienne des surnageants des souches *L. lactis* ML3, *L. lactis* NZ9000_pSec::rpedA, *L. lactis* NZ9000_pSec::s-rpedA, *L. lactis* NZ9000_pSec::l-rpedA et *L. lactis* NZ9000_pSec::nucB. Le surnageant de la souche *L. lactis* NZ9000_pSec::nucB est utilisé comme témoin négatif.

b) Détection des pédiocines sur gel de tricine

Les protéines des surnageant des souches *L. lactis* NZ9000_pSec::nucB, *L. lactis* NZ9000_pSec::s-rpedA, *L. lactis* NZ9000_pSec::l-rpedA et *L. lactis* NZ9000_pSec::rpedA, ont été séparées par SDS-PAGE. Lorsque le gel obtenu est coloré au bleu de Coomassie, une bande est visible entre 3,5 et 6,5 kDa pour les surnageants des souches *L. lactis* NZ9000_pSec::s-rpedA, *L. lactis* NZ9000_pSec::l-rpedA et *L. lactis* NZ9000_pSec::rpedA (Figure 26A ; lignes 4, 3 et 2). Aucune bande n'est observée dans le surnageant issu de la culture de la souche *L. lactis* NZ9000_pSec::nucB (figure 26A ; ligne 5). Sur gel d'activité (Figure 26B, lignes 4, 3 et 2), des zones d'inhibition sont observées pour les masses compatibles avec les masses attendues pour les dérivés de la pédiocine : S-Rpédiocine, L-Rpédiocine, et Rpédiocine de 4,8 kDa, 5,5 kDa et 4,6 kDa, respectivement.

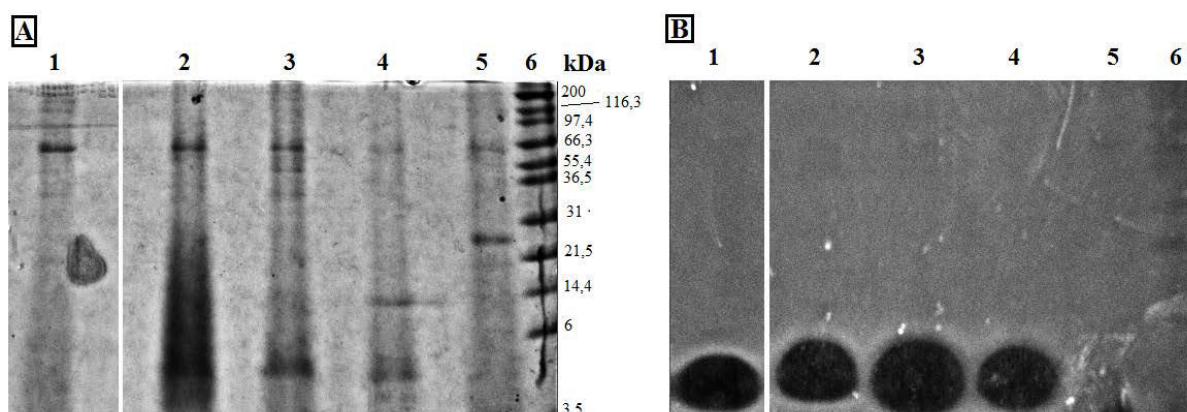


FIGURE 26 – SDS-PAGE en gel de tricine. Les surnageants contenant NucB et les dérivés recombinants de la pédiocine ont été précipités à l'aide de sulfate d'ammonium. Les protéines ont été déposées sur deux gels de polyacrylamide (11%). Après migration, un gel a été coloré au bleu de Coomassie (A) et l'autre a été recouvert avec un milieu gélosé de TSAYE en surfusion inoculé avec la souche indicatrice *C. maltaromaticum* DSM20730_pSec::nucB_pOri23 (B). Un marqueur de taille a été déposé dans le puits correspondant à la ligne 6. Dans les puits correspondant aux lignes 1, 2, 3, 4 et 5, les surnageants correspondant aux souches *L. lactis* ML3, *L. lactis* NZ9000_pSec::rpedA, *L. lactis* NZ9000_pSec::l-rpedA, *L. lactis* NZ9000_pSec::s-rpedA, *L. lactis* NZ9000_pSec::nucB, *L. lactis* ML3 ont été déposés.

Sur le gel coloré au bleu de Coomassie, une bande inattendue correspondant à une protéine d'environ 14,4 kDa (Figure 26A ligne 4), soit environ 3 fois la masse de la S-Rpédiocine, est observée. Cette bande n'est pas observée pour les autres souches.

c) Concentration minimale inhibitrice

Les CMI des surnageants contenant les dérivés recombinants de la pédiocine ont été déterminées selon la méthode des puits en gélose et en utilisant la souche *C. maltaromaticum* DSM20730_pSec::nucB_pOri23 comme souche indicatrice (Tableau 12). Les CMI des pédiocines S-Rpédiocine, L-Rpédiocine et Rpédiocine sont respectivement de $1,20 \pm 0,10 \mu\text{M}$; $1,20 \pm 0,20 \mu\text{M}$ et $1,50 \pm 0,30 \mu\text{M}$. Ces résultats montrent que les séquences codant les pro-peptides SD et LEISSTCSA n'ont pas d'effet majeur sur l'activité de la pédiocine recombinante produite dans les surnageants de culture.

Une CMI de $0,05 \mu\text{M}$ a été mesurée dans les mêmes conditions que précédemment pour la pédiocine PA-1 sauvage produite par *P. acidilactici* (Tableau 12). Ce résultat montre que les dérivés recombinants de la pédiocine, Rpédiocine incluse (laquelle présente une structure primaire identique à la pédiocine sauvage) sont environ trente fois moins actifs que la pédiocine PA-1 sauvage produite par *P. acidilactici*.

Tableau 12 – Concentration minimale inhibitrice

Souche productrice	Produit	CMI ^{b,c}
<i>P. acidilactici</i> ^a	Pédiocine PA-1	0,05 ± 0,00
<i>L. lactis</i> NZ9000_pSec:: <i>rpda</i>	Rpédiocine	1,50 ± 0,30
<i>L. lactis</i> NZ9000_pSec:: <i>s-rpda</i>	S-Rpédiocine	1,20 ± 0,10
<i>L. lactis</i> NZ9000_pSec:: <i>l-rpda</i>	L-Rpédiocine	1,20 ± 0,20
<i>L. lactis</i> ML3	ML3-Rpédiocine	< 0.07

a. pédiocine commercialisée par Sigma-Aldrich (Saint-Louis, USA)

b. moyenne de trois répétitions biologiques ± écart type

c. exprimée en µM équivalent pédiocine PA-1

III.3 Amélioration du potentiel antibatérien de la pédiocine recombinante par co-production avec la protéine PedC

III.3.1 Introduction

Les résultats de la section 1 ont montré que les dérivés recombinants de la pédiocine produits par *L. lactis* NZ9000_pSec::*rpda*, *L. lactis* NZ9000_pSec::*s-rpda* et *L. lactis* NZ9000_pSec::*l-rpda* sont moins actifs que la pédiocine PA-1 sauvage produite par le producteur naturel *P. acidilactici*. Ce phénomène a déjà été décrit lorsque les bactériocines entéroline A (BORRERO *et al.* 2011a ; MARTÍN *et al.* 2007b), sakacine A (JIMÉNEZ *et al.* 2013), divercine RV41 (BERMÚDEZ-HUMARÁN *et al.* 2007) et pédiocine PA-1 (FIMLAND *et al.* 2000 ; JOHNSEN *et al.* 2000 ; MARTÍN *et al.* 2007a) sont produites de façon hétérologue. L'auto-agrégation, la dégradation et/ou une mauvaise conformation des bactériocines sont les trois hypothèses avancées pour expliquer cette faible activité (BORRERO *et al.* 2011a ; JIMÉNEZ *et al.* 2013).

La pédiocine PA-1 possède un premier pont disulfure en N-terminal et un deuxième pont disulfure en C-terminal. Ces ponts jouent un rôle important dans l'activité et le spectre d'action de la pédiocine PA-1 (FIMLAND *et al.* 1996, 2000, 2005). Lorsque la pédiocine PA-1 était produite de façon hétérologue chez *Lb. sakei* Lb790, trois isoformes, correspondant à des mésappariements des cystéines, sont produites. De plus, une seule isoforme est obtenue lorsque la pédiocine PA-1 est produite par un producteur naturel (Figure 27 ; FIMLAND *et al.* 2000 ; JOHNSEN *et al.* 2000). Il est donc possible qu'une mauvaise conformation des ponts disulfures soit responsable de la perte d'activité des dérivés recombinants de la pédiocine dans notre contexte expérimental. Une hypothèse est que

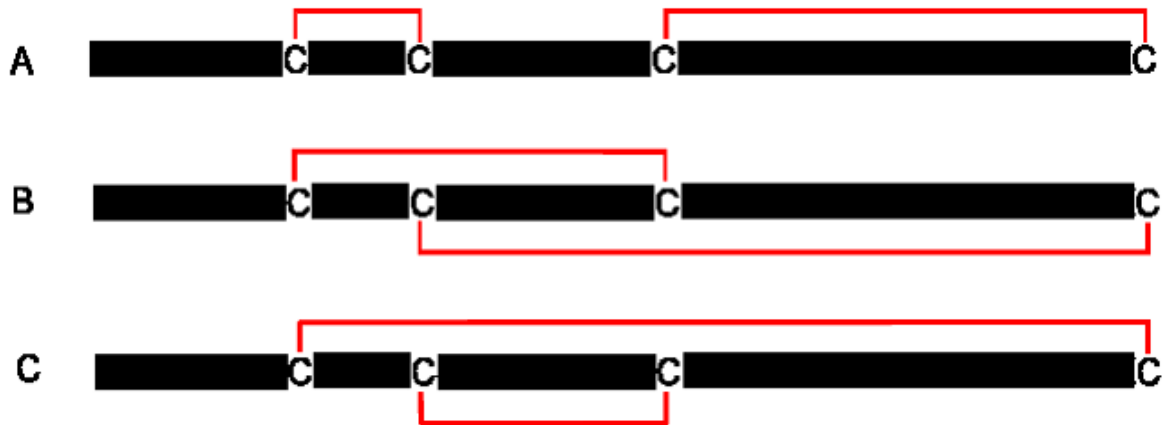


FIGURE 27 – Combinaison possible des ponts disulfures chez la pédiocine PA-1 d’après FIMLAND *et al.* 2000. Les ponts disulfures de la pédiocine peuvent être formés de trois façons différentes. La figure A présente la formation native des ponts disulfures. En B et C sont présentés les deux autres appariements des cystéines qui correspondent à des formes moins actives de la pédiocine.

le producteur naturel possède une protéine favorisant la formation d’une isoforme unique ayant une activité optimale. Une autre hypothèse permettant d’expliquer ces faibles activités est que les conditions de culture ne favorisent pas la formation de ponts disulfures. Dans le cadre de cette hypothèse, les cystéines seraient sous forme réduite. En outre, Il a aussi été montré que la perte du deuxième pont disulfure de la pédiocine PA-1 conduisait à une perte d’activité de cette dernière (FIMLAND *et al.* 2000). Il a donc été décidé d’analyser le statut des ponts disulfures par MALDI-TOF.

III.3.2 Statut des ponts disulfures de la pédiocine

L’analyse du statut des cystéines de la pédiocine recombinante nécessite des quantités importantes de protéines pures. Pour cela une pédiocine recombinante ayant une étiquette polyhistidine a été produite chez *L. lactis* et purifiée.

a) Construction d’un vecteur permettant d’exprimer la protéine H-Rpédiocine

Structure du gène synthétique codant la H-Rpédiocine. Le gène synthétique présenté en figure 23D (page 85) code une protéine nommée H-Rpédiocine composée de 6 domaines : (i) le peptide SP_{Usp45}, (ii) le pro-peptide SD, (iii) un peptide hexahistidine (iv) un peptide charnière SSG, (v) le site de clivage à l’entérokinase (DDDDK) et (vi) le gène $\Delta_{sp}pedA$.

Les résultats présentés dans la section 1 ont montré que l'insertion d'une séquence codant le pro-peptide SD ou le pro-peptide LEISSTCDA permet d'augmenter la productivité spécifique de la pédiocine recombinante sans impact majeur sur l'activité antibactérienne. Ces résultats suggèrent que la partie N-terminale de la pédiocine peut subir des greffages sans impact sur l'activité antibactérienne de cette dernière. Le pro-peptide SD étant plus petit que le peptide LEISSTCDA, ce premier a été retenu pour améliorer la sécrétion de la H-Rpédiocine.

Le site de clivage de l'entérokinase doit permettre, après purification de la H-Rpédiocine, de séparer la pédiocine mature du greffon dans le cas où la protéine obtenue ne présente pas d'activité antibactérienne. Une étape de purification par RP-HPLC ou un deuxième passage en IMAC sera alors nécessaire pour séparer l'étiquette de la pédiocine PA-1 recombinante.

Construction du plasmide *pSec::h-rpedA*. La construction plasmidique (*pSec::h-rpedA*) d'intérêt a été sélectionnée par transformation de la souche *L. lactis* NZ9000. Le plasmide obtenu a été extrait et l'insert a été séquencé. Les résultats du séquençage ont montré qu'aucune mutation du gène *histag::Δ_{sp}rpedA* n'a eu lieu pendant le clonage.

b) Production et purification de la H-Rpédiocine

Production de la H-Rpédiocine en flacon de 250 mL. La souche *L. lactis* NZ9000_ *pSec::h-rpedA* a dans un premier temps, été cultivée dans un flacon de 250 mL dans le but d'évaluer l'effet du greffon sur l'activité et sur la productivité de la H-Rpédiocine. Il n'existe pas de différence significative (Student *t*-test ; *p*-value < 0,05) entre la productivité de la H-Rpédiocine (Tableau 13) et les productivités mesurées pour les autres dérivés de la pédiocine (Tableau 11, page 90). La CMI du surnageant de culture de la souche *L. lactis* NZ9000_ *pSec::h-rpedA* a été également évaluée en utilisant la souche cible *C. maltaromaticum* DSM20730_ *pSec::nucB_pOri23*. Une CMI de $1,3 \pm 0,2 \mu\text{M}$ a été mesurée pour le surnageant de la souche *L. lactis* NZ9000_ *pSec::h-rpedA*. Cette valeur de CMI est semblable aux valeurs déterminées pour les autres surnageants (*i. e.* la souche *L. lactis* NZ9000_ *pSec::rpedA*, la souche *L. lactis* NZ9000_ *pSec::s-rpedA* et la souche *L. lactis* NZ9000_ *pSec::l-rpedA* ; Tableau 12, page 93).

Ces résultats montrent que la séquence codant l'étiquette histidine n'interfère pas avec le pro-peptide SD pour la productivité de la pédiocine recombinante. De plus, une CMI semblable a été mesurée dans les surnageants des souches produisant les dérivés de la pédiocine H-Rpédiocine, Rpédiocine, S-Rpédiocine et L-Rpédiocine, ce qui semble indiquer que l'étiquette histidine n'a pas d'effet sur l'activité antibactérienne de ces peptides.

Cependant, comme pour les autres dérivés de la pédiocine produits par *L. lactis* NZ9000, il apparaît que la H-Rpédiocine est moins active que la pédiocine PA-1 produite par *P. acidilactici*.

Production de H-Rpédiocine en réacteur de 2L en condition d'agitation et de pH constant. La souche *L. lactis* NZ9000_pSec::h-rpedA a également été cultivée en fermenteur afin d'augmenter la production globale de H-Rpédiocine (Tableau 13). La biomasse obtenue en fermenteur est approximativement 3,7 fois plus élevée que la biomasse obtenue en flacon de 250 mL sans contrôle du pH. La quantité de H-Rpédiocine dosée dans le surnageant de culture réalisée en fermenteur de 2 L est supérieure à celle dosée dans le surnageant de culture réalisée en flacon de 250 mL. Toutefois, la productivité spécifique de la H-Rpédiocine en flacon de 250 mL semble supérieure à la productivité spécifique en fermenteur.

Tableau 13 – Production de la H-Rpédiocine et croissance de la souche *L. lactis* NZ9000_pSec::h-rpedA

	Concentration ^a	μ_{max} ^b	DO _{600nm} finale	Productivité spécifique ^c
Flacon de 250 mL ^d	2,4 ± 0,2	0.76 ± 0,2	2,3 ± 0,1	3,60 ± 0,23
Bioréacteur de 2 L	4,5	1,1	8,6	2

a. concentration de H-Rpédiocine dosée dans le surnageant en μM équivalent pédiocine PA-1

b. exprimé en h^{-1}

c. exprimée en μmol équivalents pédiocine PA-1/g de bactéries

d. moyenne de trois répétitions biologiques ± écart type

Purification de la H-Rpédiocine. Après culture en fermenteur, les constituant du surnageant de culture contenant la H-Rpédiocine ont été séparés par IMAC. Pour détecter la H-Rpédiocine dans les différentes fractions d'élution, l'activité antibactérienne de ces fractions a été évaluée en suivant la méthode des puits en gélose et en utilisant la souche cible *C. maltaromaticum* DSM20730_pSec::nucB_pOri23. Le suivi d'activité a révélé que la H-Rpédiocine a été récoltée dans la fraction correspondant à l'élution à 20 mM. Cette fraction correspond à la fraction de lavage de la colonne ce qui semble indiquer que la protéine ne s'est pas accrochée sur la résine.

c) Analyse du statut des ponts disulfures de la protéine H-Rpédiocine par MALDI-TOF

Le statut des ponts disulfures de la H-Rpédiocine a été étudié par spectrométrie de masse. Pour réaliser les analyses de masse, la protéine H-Rpédiocine a dans un premier temps subi une digestion trypsique. Les hydrolysats (Figure 28) ont ensuite subi une alkylation par de l'iodoacétamide. Dans le cas où une ou plusieurs cystéines seraient sous forme réduite, un nombre de molécules d'iodoacétamide égal au nombre de cystéines réduites seront liées covalamment aux dérivés tryptiques de la H-Rpédiocine. Il sera alors possible de déterminer combien de cystéines sont sous forme réduite.

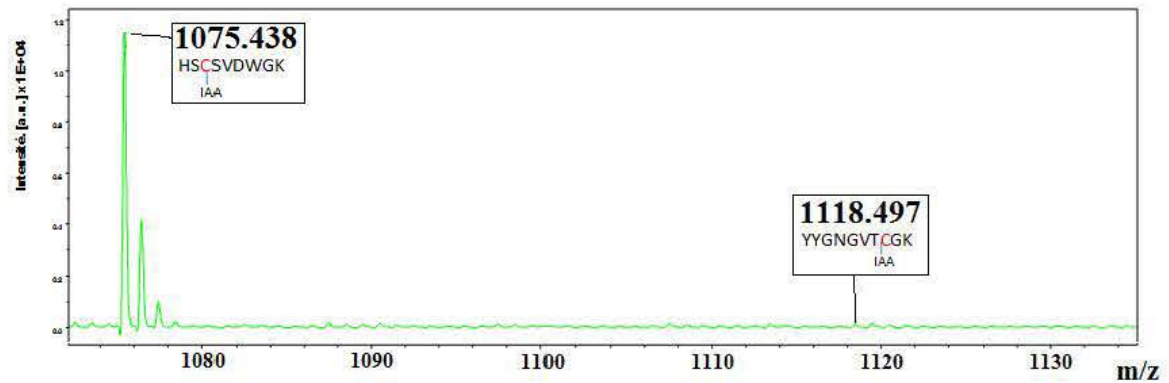
Quatre peptides dont les masses sont de 1075 Da, 1118 Da, 2455 Da et 2470 Da ont été détectés par MALDI-TOF (Figure 29). Le peptide ayant une masse de 1075 Da semble correspondre à la séquence peptidique HSCSVDWGK liée à une molécule d'iodoacétamide, indiquant que la cystéine C30 est sous forme réduite. Cette séquence a été confirmée par une analyse MS/MS. La séquence des autres peptides n'a pas pu être confirmée en MS/MS en raison d'une trop faible quantité. La masse de 1118 Da est compatible avec la séquence peptidique YYGNGVTCGK pour laquelle une molécule d'iodoacétamide est liée suggérant que la cystéine C25 est également sous forme réduite. Le pic correspondant à une masse de 2454 Da est compatible avec un peptide dans lequel les cystéines C40 et C60 forment un pont disulfure, l'hydrolyse par la trypsine de la liaison peptidique entre la lysine K59 et la cystéine C60 n'aurait pas eu lieu (Figure 29). Le pic ayant une masse de 2470 Da pourrait correspondre à ce même peptide présentant une oxydation de la méthionine. En effet, la masse d'une molécule d'oxygène est de 16 Da et la différence de masse entre ces deux masses est de 15 Da.

Ces analyses suggèrent que le pont disulfure présent dans la région C-terminale de la pédiocine est correctement formé ; en revanche, le ponts présent en région N-terminale ne l'est pas.

Peptide	Masse	
SDHHHHHHSSGDDDDKYYGNGVTC ₂₅ GKHSC ₃₀ SVDWGKATTC ₄₀ IINNGAMAWATGGHQGNHKC ₆₀	6468 Da	A
HSC ₃₀ SVDWGK IAA	1075 Da	
YYGNGVTC ₂₅ GK IAA	1118 Da	
ATTC ₄₀ IINNGAMAWATGGHQGNHK IAA	2410 Da	B
ATTC ₄₀ IINNGAMAWATGGHQGNHKC ₆₀ IAA	2570 Da	
ATTC ₄₀ IINNGAMAWATGGHQGNHK YYGNGVTC ₂₅ GK	3394 Da	
HSC ₃₀ SVDWGK C ₆₀	1139 Da	C
HSC ₃₀ SVDWGK ATTC ₄₀ IINNGAMAWATGGHQGNHK	3351 Da	
YYGNGVTC ₂₅ GK C ₆₀	1182 Da	D
YYGNGVTC ₂₅ GK HSC ₃₀ SVDWGK	2059 Da	
C ₆₀ ATTC ₄₀ IINNGAMAWATGGHQGNHK	2473 Da	E
ATTC ₄₀ IINNGAMAWATGGHQGNHKC ₆₀	2455 Da	

FIGURE 28 – Masse théorique attendue après digestion trypsique de la H-Rpédiocine. Structure de la H-Rpédiocine (A), hypothèse selon laquelle il n'y a pas de pont disulfure (B). Hypothèses selon lesquelles un pont est formé entre les cystéines 40 et 25 et entre les cystéines 30 et 60 (C), ou entre les cystéines 30 et 40 et les cystéines 60 et 25 (D), ou encore entre les cystéines 25 et 30, et les cystéines 60 et 40. Conformation native (E). IAA, iodoacétamide.

A



B

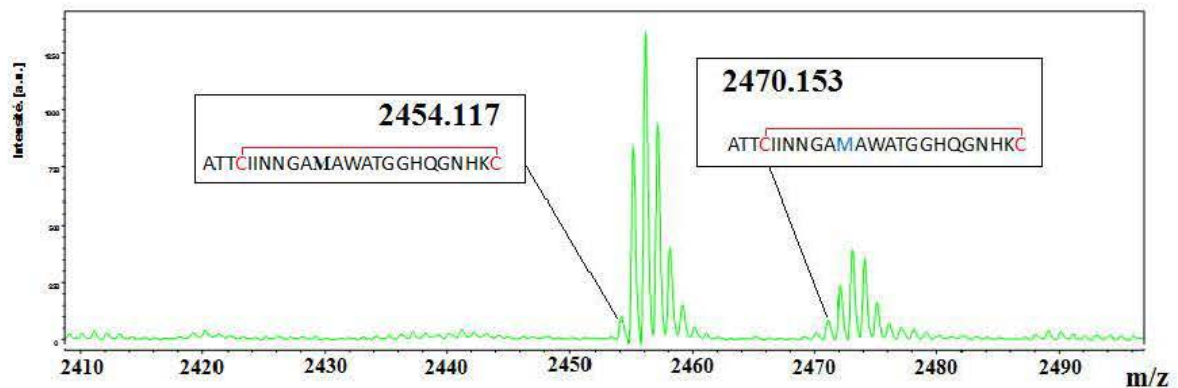


FIGURE 29 – Spectre MALDI-TOF de la H-Rpédiocine digérée par la trypsine. Les masses de chaque pic correspondant à des fragments de la pédiocine sont indiquées. Quatre molécules dont les masses sont de 1075 Da, 1118 Da (A) et 2455 Da, 2470 Da ont été détectées. La molécule ayant une masse de 1075 Da est compatible avec la masse d'un peptide ayant comme séquence HSCSVDWGK liée à une molécule d'iodoacétamide. La molécule de 1118 Da est compatible avec le peptique YGNGVTGK pour laquelle une molécule d'iodoacétamide est liée. La molécule de 2454 Da est compatible avec le peptide ATTCTINNGAMAWATGGHQQGNHKC dans lequel un pont disulfure serait formé entre les deux cystéines (C40 et C60) et pour lequel l'hydrolyse par la trypsine de la liaison peptidique entre la lysine K59 et la cystéine C60 n'aurait pas eu lieu. La molécule de 2470 Da semble correspondre à ce dernier peptide mais pour lequel la méthionine est oxydée. Une méthionine oxydée est indiquée par un M de couleur bleu. IAA, iodoacétamide.

III.3.3 *Lactococcus lactis* ML3

L'opéron permettant de produire la pédiocine sauvage comprend, en plus du gène codant la pédiocine (*pedA*), trois autres gènes : *pedB*, *pedC*, et *pedD*. Afin de déterminer si ces gènes sont responsables de la différence d'activité entre la pédiocine sauvage et les dérivés recombinants de la pédiocine, l'opéron *pedABCD* a été cloné chez *L. lactis* ML3 et exprimé *via* le système NICE (souche transmise par John Renye; RENYE et SOMKUTI 2010). La souche résultante a été cultivée dans les mêmes conditions que les autres souches produisant les dérivés recombinants de la pédiocine. Le poids sec, $\mu_{\max}$ et la DO_{600nm} finale de la souche *L. lactis* ML3 ont été mesurés et comparé aux autres souches (tableau 10, page 89). Il existe une différence significative (Student *t*-test; *p*-value < 0,05) entre le $\mu_{\max}$ et la DO_{600nm} finale mesuré pour la souche *L. lactis* ML3 et les $\mu_{\max}$ et la DO_{600nm} finale mesurés pour les autres souches. Ces résultats montrent une différence de croissance entre ces souches. La productivité de la souche *L. lactis* ML3 n'a pas pu être mise en évidence de manière certaine, car la quantité de pédiocine produite est inférieure à la quantité détectable en ELISA. La valeur seuil de détection de l'ELISA étant de 300 ng/mL, la souche doit produire moins de 300 ng/mL, soit une productivité < 0,44 μmol équivalent pédiocine/g de bactéries. En outre, après une dilution au quart du surnageant ce dernier ne présente plus d'activité antibactérienne vis-à-vis de la souche *C. maltaromaticum* DSM20730_pSec::*nucB*_pOri23. Ce résultat nous a permis d'estimer que la CMI de cette souche était < 0,07 μM . Cette valeur est inférieure aux valeurs de CMI déterminées pour les surnageants des autres souches produisant des dérivés recombinants de la pédiocine (Tableau 12; page 93). Les protéines présentes dans le surnageant de la souche *L. lactis* ML3 ont également été analysées. Aucune bande n'est visible sur le gel coloré au bleu de Coomassie à la taille attendue pour la pédiocine (figure 26A, ligne 1; page 92) bien qu'une zone d'activité soit visible sur le gel d'activité préparé en parallèle (figure 26B, ligne 1; page 92). Ce résultat est en accord avec les résultats de dosages ELISA montrant que la souche *L. lactis* ML3 produit de faibles quantités de pédiocine. Ces derniers résultats suggèrent que sur l'opéron de la pédiocine il existe une ou plusieurs protéines nécessaires pour que le potentiel antibactérien de la pédiocine soit optimal.

III.3.4 Analyses *in silico* : hypothèse quant au rôle potentiel de PedC

Il a été précédemment démontré que lorsque la pédiocine PA-1 était produite de façon hétérologue chez *Lb. sakei* Lb706, les cystéines étaient mésappariées et avaient une faible activité (FIMLAND *et al.* 2000). La formation des ponts disulfures est spontanée, dans

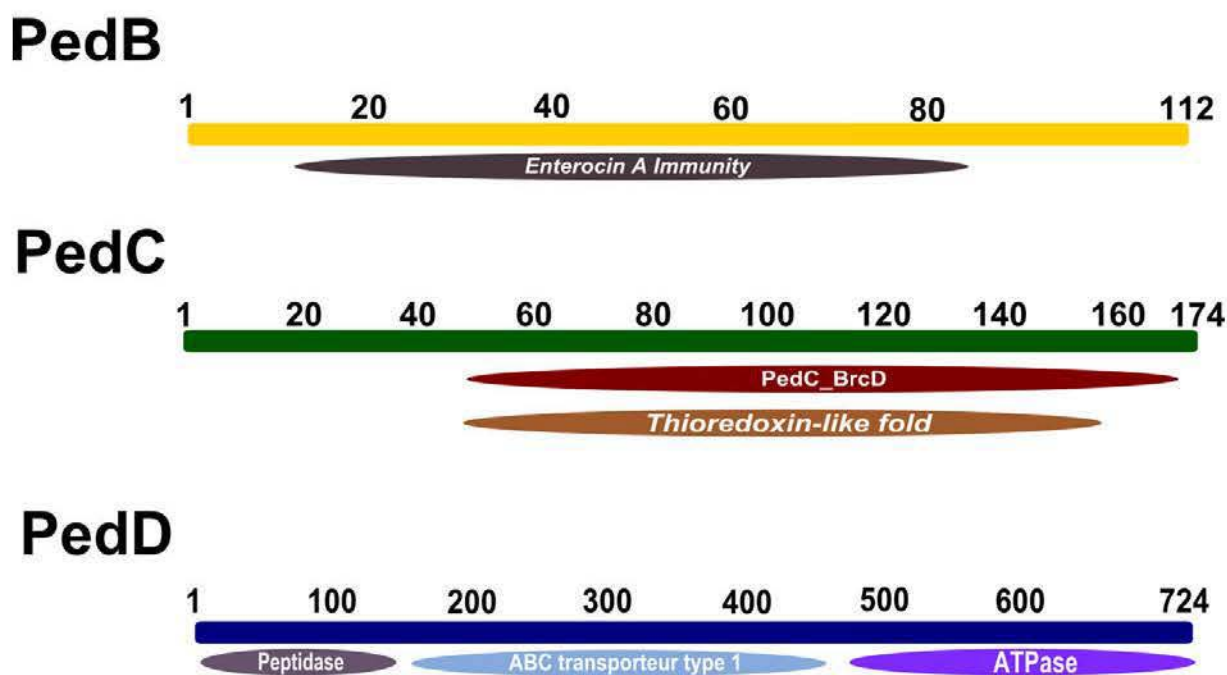


FIGURE 30 – Analyse *in silico* des protéines PedB, PedC et PedD.

la majorité des cas, cependant ce processus étant long et aspécifique (ANFINSEN 1973), il est catalysée par des enzymes appelées TDOR (KADOKURA *et al.* 2003). Il a donc été supposé qu'une protéine de cette famille était responsable de la formation correcte des ponts disulfures chez les producteurs naturels de pédiocine PA-1 (FIMLAND *et al.* 2000). Les résultats concernant la souche *L. lactis* ML3 suggèrent que le gène codant cette protéine fait partie de l'opéron de la pédiocine.

L'opéron de la pédiocine est composé de quatre gènes *pedABCD*. Les protéines codées par les gènes *pedB*, *pedC* et *pedD* ont été analysé *in silico* en utilisant Interproscan (Figure 30). L'analyse a permis de déterminer que la protéine PedB est similaire à la protéine d'immunité de l'entéroccine A et que la protéine PedD est probablement un ABC transporteur présentant un domaine protéolytique permettant de sécréter et de cliver le peptide signal de la pédiocine. Les analyses ont également révélé que la protéine PedC possédait un domaine thioredoxine putatif (Interproscan ; numéro d'accension : IPR012336).

D'autres analyses de cette protéine réalisées avec BLASTp (Tableau 15) et SignalIP (Figure 31) ont révélé que la protéine PedC, précédemment annotée comme bactériocine accessoire de sécrétion (VENEMA *et al.* 1995), possède un site catalytique caractéristique des TDOR (Motif CXXC) et un peptide signal permettant sa sécrétion *via* le système Sec (Figure 31). Ces motifs permettent de supposer que le gène *pedC* code une TDOR qui aurait un rôle dans la formation des ponts disulfures de la pédiocine PA-1.

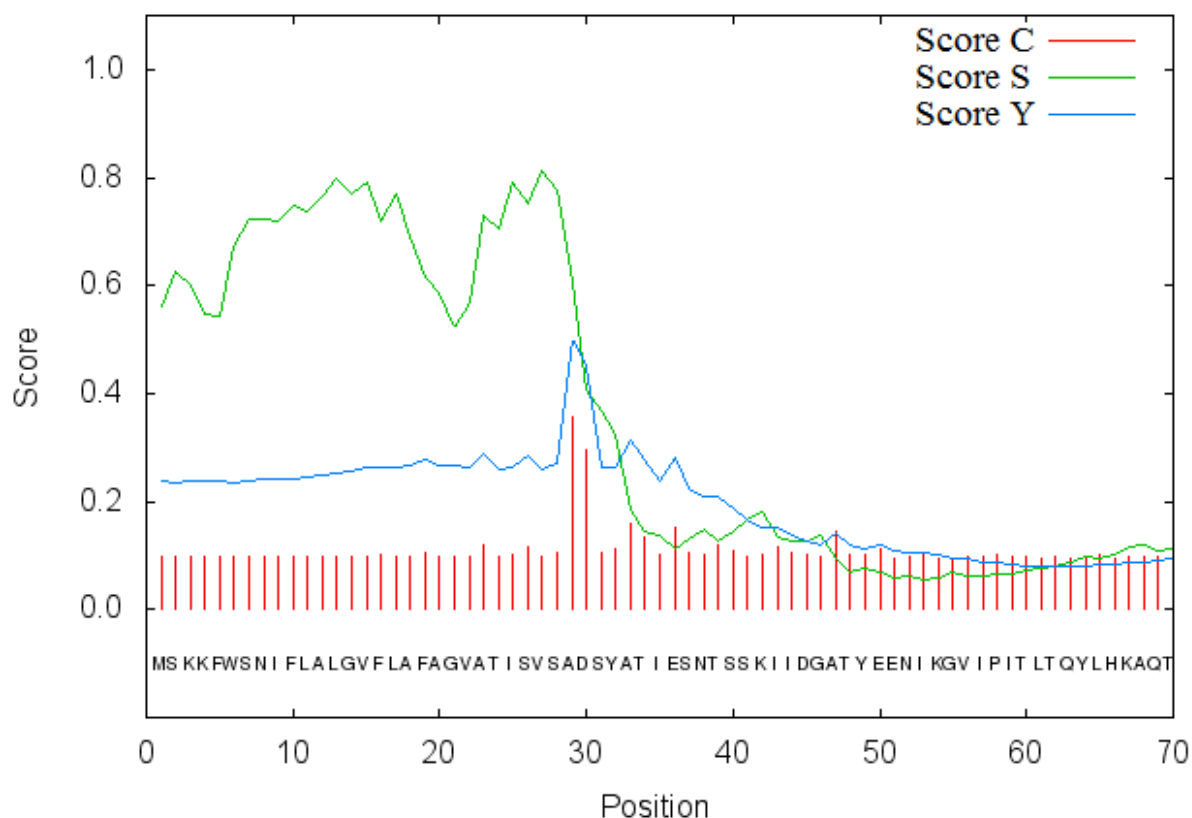


FIGURE 31 – Analyse *in silico* du peptide signal de PedC. Le score C permet de prédire le site de clivage du peptide signal. Ce score est très élevé juste après le site de clivage du peptide signal. Le score S permet de distinguer les acides aminés faisant partie du peptide signal de ceux faisant partie de la protéine mature. Le score Y est une moyenne géométrique des scores C et de la pente des scores S. Le graphique montre les trois scores (C, S et Y) pour chaque position de la séquence. Un peptide signal est prédit, celui-ci serait clivé entre les acides aminés en position 28 et 29.

III.3.5 Co-production des dérivés recombinants de la pédiocine avec PedC

Tableau 14 – Productivité spécifique et CMI des pédiocines recombinantes co-produites avec la protéine PedC.

Souche	Produit	Productivité spécifique ^{b,c}	CMI ^{a,c}
<i>L. lactis</i> NZ9000_pSec:: <i>s-rpedA</i> _pOri:: <i>pedC</i>	S-Rpédiocine	1,39 ± 0,02	0,40 ± 0,10
<i>L. lactis</i> NZ9000_pSec:: <i>s-rpedA</i> _pOri23	S-Rpédiocine	4,03 ± 0,72	1,30 ± 0,50
<i>L. lactis</i> NZ9000_pSec:: <i>rpda</i> _pOri:: <i>pedC</i>	Rpédiocine	0,84 ± 0,06	0,50 ± 0,10
<i>L. lactis</i> NZ9000_pSec:: <i>rpda</i> _pOri23	Rpédiocine	1,30 ± 0,50	> 0,70 ± 0,10

a. exprimée en µM équivalent pédiocine PA-1
pédiocine PA-1

b. exprimée en µmol équivalent pédiocine PA-1/g de bactéries

c. moyenne de trois répétitions biologiques ± écart type

Pour évaluer le rôle de PedC sur l'activité des pédiocines recombinantes, le gène *pedC* a été cloné dans pOri23 en aval du promoteur constitutif P₂₃. Le plasmide pOri::*pedC* a ensuite été utilisé pour transformer les souches *L. lactis* NZ9000_pSec::*rpda* et *L. lactis* NZ9000_pSec::*s-rpedA*. Le résultat du séquençage du plasmide pOri::*pedC* a révélé que la séquence nucléotidique du gène *pedC* n'est pas mutée. En parallèle, les mêmes souches ont été transformées avec le plasmide pOri23 et ont été utilisées comme contrôle. Le plasmide pOri::*pedC* a également été utilisé pour transformer la souche *L. lactis* NZ9000_pSec::*nucB* ; cette souche vise à déterminer si PedC présente une activité antibactérienne propre.

Un test d'activité sur gélose a été réalisé en utilisant la souche indicatrice *C. maltaromaticum* DSM20730_pSec::*nucB*_pOri23. Les résultats montrent que les surnageants des souches co-produisant la R-pédiocine ou la S-Rpédiocine avec PedC présentent une activité antibactérienne plus importante que les surnageants des souches témoins produisant les pédiocines recombinantes R-pédiocine et S-Rpédiocine seuls (Figure 32). En revanche, aucune activité antibactérienne n'a été détectée pour le surnageant de la souche produisant la protéine PedC seule, indiquant que, dans nos conditions expérimentales, PedC ne présente pas d'activité antibactérienne observable.

Le dosage ELISA a permis de démontrer que la concentration en dérivés recombinants de la pédiocine dans les surnageants des souches transformées avec *pedC* était inférieure à la concentration en dérivés recombinants de la pédiocine dans le surnageant des souches transformées avec le plasmide pOri23 (Figure 32). Cette diminution de concentration

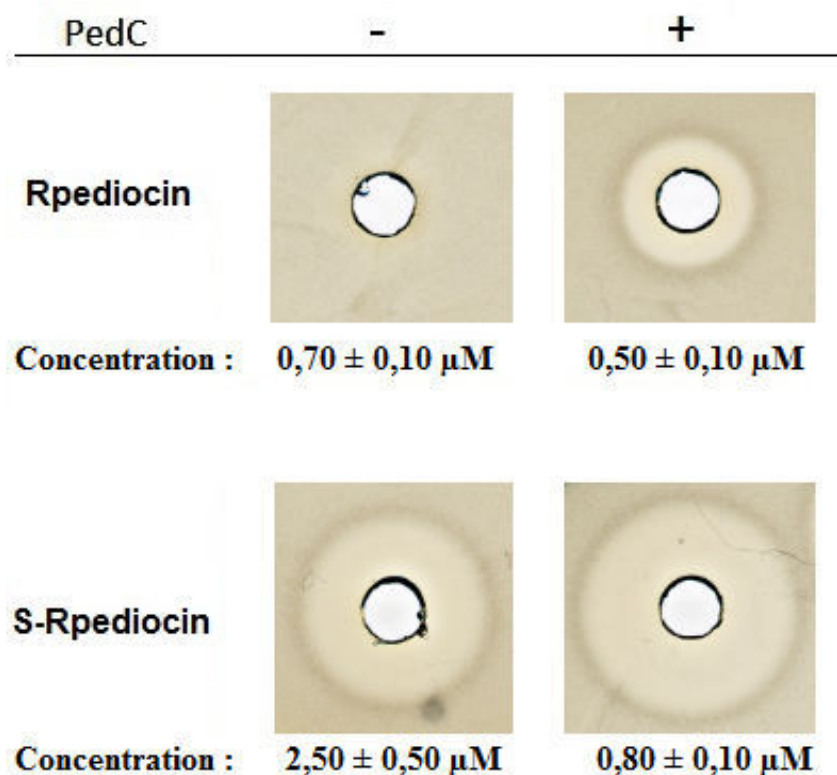


FIGURE 32 – Activité des dérivés de la pédiocine co-produits avec PedC. *L. lactis* NZ9000_pSec::s-rpedA et *L. lactis* NZ9000_pSec::rpedA ont été transformées avec pOri23 (-) ou pOri::pedC (+). L'activité produite dans les surnageants des souches a été évaluée en utilisant la souche *C. maltaromaticum* DSM20730_pSec::nucB_pOri23 comme souche indicatrice. Les concentrations sont exprimées μM équivalents pédiocine PA-1

s'accompagne d'une diminution de la productivité spécifique de la pédiocine dans les souches transformées avec *pedC* (Tableau 14). Ainsi, bien que la quantité de pédiocine produite en présence de PedC soit inférieure, l'activité antibactérienne obtenue est plus importante, indiquant que le potentiel antibactérien des dérivés de la pédiocine est plus élevé en présence de PedC.

Les CMI des surnageants des souches transformées avec pOri::pedC ou pOri23 ont été mesurées en utilisant la méthode des puits en gélose et la souche *C. maltaromaticum* DSM20730_pSec::nucB_pOri23 comme souche indicatrice. Il en résulte que, lorsque la protéine S-Rpédiocine est co-produite avec PedC, la CMI de la protéine S-Rpédiocine diminue de $1,30 \pm 0,50 \mu\text{M}$ à $0,40 \pm 0,10 \mu\text{M}$ (Tableau 14) et que la CMI de la Rpédiocine est de $0,50 \pm 0,10 \mu\text{M}$ (Tableau 14), ce qui est inférieur à la valeur précédemment obtenue ($1,50 \pm 0,30 \mu\text{M}$; Tableau 12, page 93). Ces résultats confirment que PedC permet d'augmenter l'activité antibactérienne des pédiocines recombinantes.

Aucune activité antibactérienne n'a été détectée dans le surnageant de la souche

L. lactis NZ9000_pSec::*rpda*_pOri23 bien que le dosage ELISA ait permis de doser $0,70 \pm 0,10 \mu\text{M}$. La CMI du surnageant de la souche *L. lactis* NZ9000_pSec::*rpda* étant de $1,50 \pm 0,30 \mu\text{M}$, la quantité de Rpédiocine produite par la souche *L. lactis* NZ9000_pSec::*rpda*_pOri23 n'est donc pas suffisante pour qu'une activité soit observée.

III.3.6 Recherche *in silico* d'homologues de la protéine PedC

PedC appartient à la famille des protéines accessoires de sécrétion de bactériocines PedC_BrcD (numéro d'accès Interproscan : IPR005985). Dans le but de trouver des homologues de la protéine PedC, celle-ci a été comparée à d'autres protéines appartenant à la famille des PedC_BrcD ainsi qu'à des TDOR (Tableau 15).

Tableau 15 – Homologie de séquence entre PedC, des TDOR et des protéines appartenant à la famille des protéines PedC_BrcD.

Protéine	Bactériocine	Conserve Domain Database	Identité de séquence par rapport à PedC	Pourcentage de recouvrement par rapport à PedC	<i>e-value</i>
PedC	Pédiocine PA-1	TRX_family PedC_BrcD Thioredoxin_2	100%	100%	3,00E-133
SkgC	Sakacine G	TRX_family PedC_BrcD Thioredoxin_2	47%	93%	1,00E-056
CoaC	Coaguline A	TRX_family PedC_BrcD Thioredoxin_2	99%	100%	3,00E-132
PlaC	Plantaricin 423	TRX_family PedC_BrcD Thioredoxin_2	99%	100%	1,00E-132
MesC	Mésentéroline Y105	TRX_family Thioredoxin_2	25%	45%	1,00E-005
LecX	Leucocine C	TRX_family Thioredoxin_2	25%	39%	6,00E-006
LcaE	Leucocine A	TRX_family Thioredoxin_2	25%	39%	4,00E-006
BlpG _{st}	Thermophiline 13	TRX_family PedC_BrcD Thioredoxin_2	26%	78%	2,00E-008
BdbA	Sublancine 168	TRX_family Thioredoxin_2	17%	56%	4,00E-005

Les protéines CoaC, PlaC, SkgC, LcaE, MesC, LecX sont toutes des protéines de la famille PedC_BrcD et font respectivement partie des clusters de gènes nécessaires à la biosynthèse de bactériocines de la sous-classe IIa suivante : coaguline A, plantaricine 423, sakacine G, leucocine A, mésentéroïne Y105 et leucocine C (Figure 33). Ces protéines ont respectivement 99% (e-value = 3,00E-132), 99% (e-value = 1,00E-132), 47% (e-value = 3,00E-132), 25% (e-value = 4,00E-006), 25% (e-value = 1,00E-005), 25% (e-value = 6,00E-006) et 29% (e-value = 2,00E-018) de similarité avec la protéine PedC et possèdent le même domaine thiorédoxine que cette dernière (Thioredoxin_2; numéro d'accèsion Interproscan : IPR012336). Ces analyses montrent que des protéines homologues à la protéine PedC sont codés sur des *loci* de gènes impliqués dans la biosynthèse de bactériocines.

Deux études précédentes ont démontré le rôle des TDOR BlpG_{st} et BdbA dans la formation respective des ponts disulfures de la bactériocine de la sous-classe IIb, la thermophiline 13 (FONTAINE et HOLS 2008), et de la bactériocine de la classe IV, la sublancine 168 (DORENBOS *et al.* 2002). Ces deux résultats suggèrent que les TDOR interviendraient dans la maturation de bactériocines appartenant à des classes différentes. L'analyse des séquences de BdbA, BlpG_{st} et PedC a révélé que ces trois protéines sont homologues, possèdent un domaine thiorédoxine (Thioredoxin_2; numéro d'accèsion Interproscan : IPR012336). L'analyse de séquence a également montré que BlpG_{st} et PedC appartiennent à la même famille de protéines accessoires de transport (PedC_BrcD; numéro d'accèsion Interproscan : IPR005985; Tableau 15). Ce dernier résultat suggère que les protéines BlpG_{st} et PedC ont des fonctions apparentées.

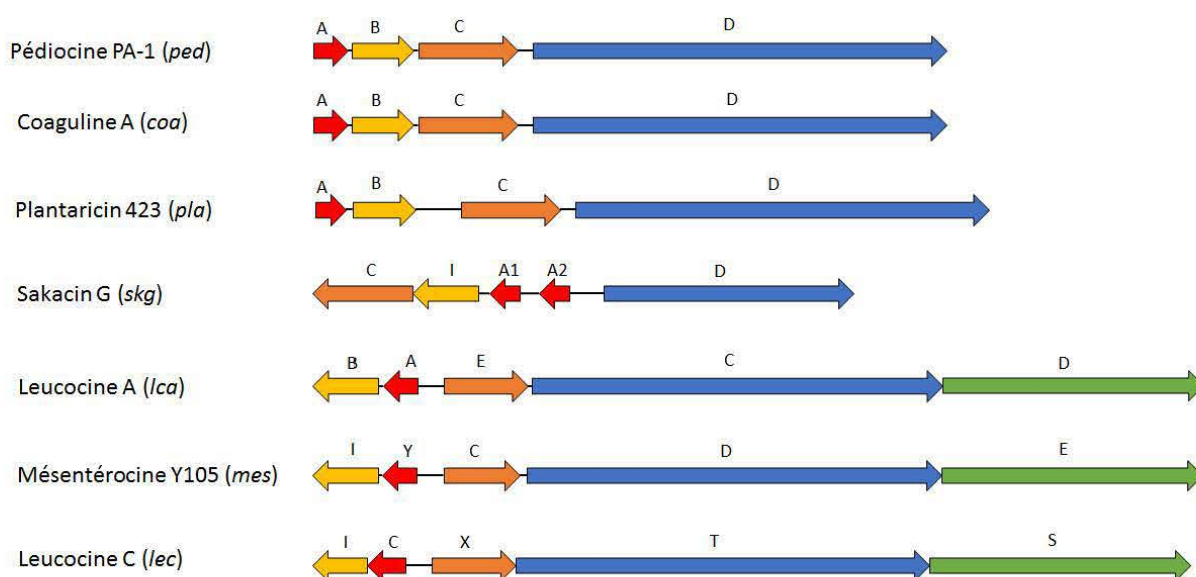


FIGURE 33 – Structure génétique des clusters de gènes codant pour des bactériocines de la sous-classe IIa et contenant un homologue de la protéine PedC. Les gènes codant des bactériocines sont en rouge, les gènes codant les protéines d'immunité sont en jaune, les gènes codant des protéines accessoires de sécrétion de bactériocines de la famille des Mesenteric_y105 (numéro d'accèsion interproscan : IPR005696) sont en vert, les gènes codant des protéines de transport ABC de bactériocines sont en bleu, les gènes codant des protéines homologues de PedC sont en orange.

III.4 Expression hétérologue de la pédiocine chez *Carnobacterium maltaromaticum* DSM20730

III.4.1 Introduction

Durant cette thèse deux bactéries hôtes ont été utilisées pour produire la pédiocine recombinante : *L. lactis* et *C. maltaromaticum*. *Lactococcus lactis* a été choisie, car c'est une bactérie lactique modèle pour laquelle il existe de nombreux travaux sur l'expression hétérologue (MORELLO *et al.* 2008 ; PONTES *et al.* 2011). La capacité de *C. maltaromaticum* à produire la pédiocine recombinante a également été évaluée. Les bactéries de ce genre ont été décrites comme capable de produire simultanément plusieurs bactériocines (*e. g.* divercine V41, divergicine M35, carnobactériocine BM1, carnobactériocine B2, carnobactériocine A) (AFZAL *et al.* 2010 ; LEISNER *et al.* 2007). Il est donc possible que cette souche soit performante pour la production de bactériocines.

Pour permettre la sécrétion de la pédiocine PA-1 par *C. maltaromaticum* DSM20730, il a été décidé d'utiliser le système NICE. Pour que ce système fonctionne chez *C. mal-*

taromaticum, il est nécessaire de la transformer avec les gènes *nisR* et *nisK* (MIERAU et KLEEREBEZEM 2005) et comme elle est naturellement sensible à la pédiocine PA-1, il faut la transformer avec le gène codant la protéine d'immunité de la pédiocine PA-1. Le plasmide pRSN*pedA* (RENYE et SOMKUTI 2010) permet l'expression des gènes codant les protéines NisR et NisK ainsi que de l'ensemble des gènes qui constituent l'opéron de la pédiocine PA-1 dont le gène *pedB* codant la protéine d'immunité de la pédiocine. C'est pourquoi ce plasmide a été choisi comme vecteur pour exprimer la pédiocine PA-1 chez *C. maltaromaticum* DSM20730.

III.4.2 Résultats

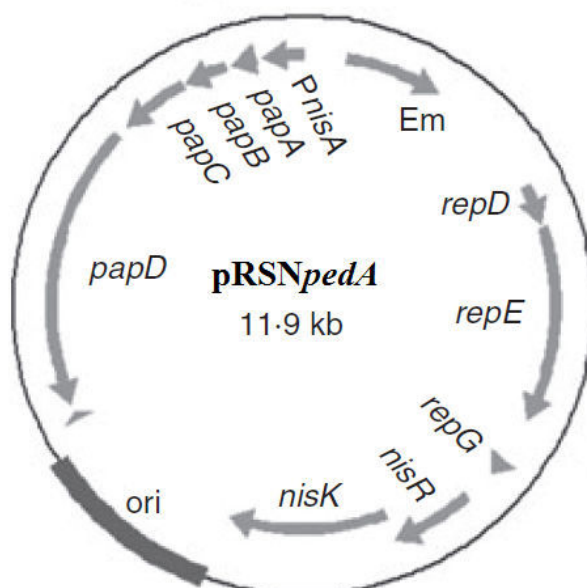


FIGURE 34 – Carte du plasmide pRSN*pedA* d'après RENYE et SOMKUTI 2010. L'opéron de la pédiocine (*papA-D*) a directement été inséré en aval du promoteur inducible *P_{nisA}*. Les gènes *nisR* et *nisK* codent les protéines impliquées dans la régulation du promoteur *P_{nisA}*. Les gènes de réplication chez les bactéries gram positives *repD*, *repE* et *repG* sont indiqués ainsi que l'origine de réplication utilisée pour la réplication du plasmide chez les bactéries gram négatives (*ori*).

La souche *C. maltaromaticum* DSM20730 a été transformée en utilisant le plasmide pRSN*pedA* (Figure 34). La souche résultant, *C. maltaromaticum* DSM20730_pRSN*pedA*, a été cultivée dans un tube de 15 mL en utilisant les conditions d'induction décrites pour *L. lactis* (*i. e.* induction à DO_{600nm} 0,4 avec une concentration sub-inhibitrice de nisine de

0,1 µg/mL). Une culture sans induction a également été réalisée pour vérifier que la souche *C. maltaromaticum* DSM20730 ne produit pas une substance antibactérienne. La souche *L. lactis* ML3 a été cultivée dans les mêmes conditions. L'activité produite dans le surnageant de ces souches a été évaluée en utilisant un test d'inhibition sur gélose et la souche *C. maltaromaticum* DSM20730_pSec::nucB_pOri23 comme souche indicatrice (Tableau 16). Sans induction aucune zone d'inhibition n'est observée pour les deux souches, ce qui démontre que les souches ne produisent pas de composé ayant une activité antibactérienne contre la souche indicatrice. Les surnageants des deux souches produisent des halos d'inhibition de dimension comparable, ce qui suggère que les deux souches produisent la même quantité de pédiocine PA-1.

Ces résultats indiquent que la souche *C. maltaromaticum* DSM20730_pRSNpedA est capable de produire une pédiocine recombinante active.

Tableau 16 – Activité antibactérienne produite par les souches *L. lactis* ML3 et *C. maltaromaticum* DSM20730_pRSNpedA

Souche	Diamètre d'inhibition ^{a,d}	
	Induit ^b	Non-induit ^c
<i>C. maltaromaticum</i> DSM20730_pRSNpedA	13	0
<i>L. lactis</i> ML3	13	0

a. Exprimé en mm

b. Le surnageant utilisé provient d'une souche cultivée en condition d'induction (induction à $DO_{600nm} = 0,4$ avec une concentration sub-inhibitrice de nisine de 0,1 µg/mL)

c. Le surnageant utilisé provient d'une souche qui n'a pas été cultivée en condition d'induction

d. Les diamètres d'inhibition ont été obtenus en utilisant la souche *C. maltaromaticum* DSM20730_pSec::nucB_pOri23 comme souche indicatrice

Chapitre IV

Discussion & Perspectives

IV.1 Évaluation du système d'expression hétérologue permettant la production de pédiocines chimériques

IV.1.1 *Lactococcus lactis*

La bactérie *L. lactis* a été utilisée pour produire des dérivés recombinants de la pédiocine, car c'est un hôte efficace pour produire la pédiocine PA-1 (ARQUÉS *et al.* 2008 ; BUYONG *et al.* 1998 ; « Cloning of pediocin PA-1 and its immunity genes from » 2008 ; HORN *et al.* 1998, 1999, 2004 ; LI *et al.* 2011 ; MARTÍN *et al.* 2007a ; MARTÍNEZ *et al.* 2000 ; RENYE et SOMKUTI 2010 ; RENYE *et al.* 2011 ; REVIRIEGO *et al.* 2005, 2007a,b ; RODRIGUEZ *et al.* 2005). Pour permettre l'expression de la pédiocine PA-1 chez *L. lactis*, un protocole de transformation a été mis au point en suivant les principes décrits par HOLO et NES 1989. Dans cette publication l'efficacité de transformation a été évaluée sur neuf souches de *L. lactis* subsp. *cremoris* en utilisant le plasmide pIL253. Dans ces conditions, l'efficacité de transformation la plus basse mesurée est de $2,2.10^3$ transformants/ μ g d'ADN plasmidique et l'efficacité de transformation la plus haute mesurée est de $5,7.10^7$ transformants/ μ g d'ADN plasmidique. Avec le protocole adapté pour le laboratoire, une efficacité de transformation de $2,3.10^5$ transformants/ μ g d'ADN a été mesurée. L'efficacité de transformation semble très variable selon la souche utilisée.

Il est décrit que l'efficacité de transformation des souches *L. lactis* LM0230 et *L. lactis* ATCC 11454 a été significativement augmentée par prétraitement simultané avec des agents chimiques (acétate de lithium et dithiothreitol) perturbant la paroi cellulaire. L'efficacité de transformation de la souche *L. lactis* LM0230 a été augmentée de $1,2.10^5$ à $2,3.10^9$ transformation/ μ g d'ADN et celle de la souche *L. lactis* ATCC11454 a été augmentée de $1,0.10^4$ à $1,2.10^8$ transformation/ μ g d'ADN. Ces deux souches font partie de la sous-espèce *lactis*. L'effet d'un prétraitement avec les mêmes agents chimiques sur des souches de la sous-espèce *cremoris*, dont fait partie *L. lactis* NZ9000 n'a pas été étudié à notre connaissance (PAPAGIANNI *et al.* 2007). Un traitement identique pourrait permettre une augmentation de l'efficacité de transformation de la souche *L. lactis* NZ9000.

IV.1.2 *Carnobacterium maltaromaticum*

Le système NICE est le système d'expression inductible le plus utilisé chez *L. lactis* (MIERAU *et al.* 2005 ; MORELLO *et al.* 2008). Ce système a été transféré à d'autres bactéries dont *Leuconostoc lactis* NZ6091, *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 (KLEEREBEZEM

et al. 1997), *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecali*, *Bacillus subtilis* (EICHENBAUM *et al.* 1998), *Lactobacillus plantarum* (PAVAN *et al.* 2000), *Lactobacillus brevis* (AVALL-JÄÄSKELÄINEN *et al.* 2002) et *Streptococcus zooepidermicus* (CHONG et NIELSEN 2003). Les résultats indiquent que le système NICE est transposable à la bactérie *Carnobacterium maltaromaticum* DSM20730 et qu'il permet la production de pédiocine PA-1 dans les mêmes proportions que chez *L. lactis* ML3.

Il existe peu de systèmes d'expression chez les bactéries du genre *Carnobacterium*. Le promoteur constitutif P₃₂ a déjà été utilisé pour produire la brochocine C (GARNEAU *et al.* 2003). Il a également été envisagé d'utiliser le système de régulation à trois composantes de la biosynthèse de la carnobactériocine B2 (ROHDE et QUADRI 2006). Pour le moment, l'expression hétérologue chez *Carnobacterium* a principalement été utilisée pour produire des bactériocines (ALLISON *et al.* 1995; GARNEAU *et al.* 2003). Il a été montré que *Carnobacterium piscicola* était capable de produire jusqu'à 4 bactériocines à la fois (lacticine F, carnobactériocine BM1, carnobactériocine B2, carnobactériocine A) dont une de façon hétérologue (lacticine F; ALLISON *et al.* 1995). Nos résultats montrent qu'elle est aussi capable de produire la pédiocine PA-1.

L'absence d'outils de biologie moléculaire disponibles pour la bactérie *C. maltaromaticum*, ainsi que le manque de connaissance sur sa physiologie font que *L. lactis* est davantage utilisée pour la production de protéines recombinantes. Par le passé, l'utilisation du système NICE a facilité l'étude des bactéries des genres *Streptococcus* et *Enterococcus* et pourrait donc être un outil pour étudier la bactérie *Carnobacterium maltaromaticum*.

IV.1.3 Promoteur constitutif et promoteur inductible

Deux types de promoteurs, un promoteur constitutif et un promoteur inductible, ont été évalués pour exprimer le gène codant les dérivés recombinants de la pédiocine chez *L. lactis*. Le promoteur constitutif P₃₂ (VOSSEN *et al.* 1987), qui a été sélectionné, a déjà été utilisé pour la production de bactériocines recombinantes chez *L. lactis* (BORRERO *et al.* 2011a; CHIKINDAS *et al.* 1995; JIMÉNEZ *et al.* 2013; MARTÍN *et al.* 2007a; REVIRIEGO *et al.* 2007b). Malgré les différents essais de transformation réalisés durant ces travaux de thèse, aucun transformant ayant la séquence nucléotidique désirée n'a été obtenu.

Il est probable que l'expression constitutive des dérivés recombinants de la pédiocine par le promoteur P₃₂ soit toxique pour la bactérie *L. lactis*. Précédemment, il a été suggéré que la distance entre la fin de promoteur P₃₂ et le début du gène *pedA* pouvait avoir un impact sur le niveau l'expression de la pédiocine chez *L. lactis* (CHIKINDAS *et al.* 1995).

Dans cette étude, l'ensemble de l'opéron de la pédiocine PA-1 a été placé juste en aval du début de la phase ouverte de lecture suivante le promoteur P_{32} (ORF32). À la suite de cette séquence, une séquence Shine-Dalgarno a été ajoutée (AAGGAG) suivi d'un codon stop, localisé juste avant le codon initiateur du gène *pedA* (Figure 35). Il est supposé que le début de l'ORF32 influence l'interaction entre l'ARNm et l'ARN 16s ou contribue à l'acquisition de la structure secondaire de l'ARNm (GUCHTE *et al.* 1991).

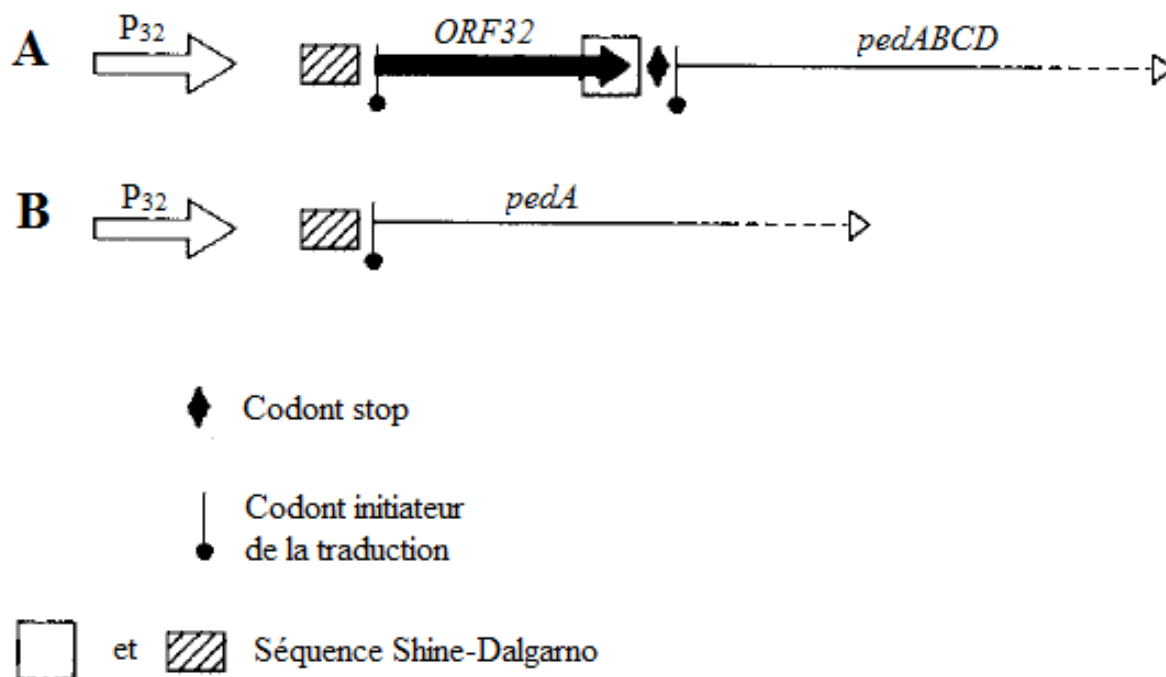


FIGURE 35 – Expression de l'opéron *pedABCD* via le promoteur P_{32} d'après CHIKINDAS *et al.* 1995 et GUCHTE *et al.* 1991. Stratégie mise en œuvre par CHIKINDAS *et al.* 1995 (A). Stratégie mise en œuvre durant cette étude (B).

Le second promoteur utilisé est le promoteur de la nisine A inductible à la nisine A. L'inductibilité permet ainsi de découpler la phase de croissance de la phase production, limitant ainsi les problèmes de toxicité éventuelle. Il est l'un des promoteurs les plus utilisés pour la production hétérologue de protéines chez *L. lactis* (MIERAU et KLEEBEZEZEM 2005) dont des bactériocines (BERMÚDEZ-HUMARÁN *et al.* 2007; BORRERO *et al.* 2011a,b; JIMÉNEZ *et al.* 2013; LI *et al.* 2011). Dans une précédente étude, l'opéron *pedABCD* a été placé sous le contrôle de ce promoteur (RENYE et SOMKUTI 2010); il a été alors démontré qu'une induction pendant deux heures avec 0,05 $\mu\text{g/mL}$ de nisine permettait d'obtenir la meilleure activité anti-*L. monocytogenes*. Cette concentration est semblable à la concentration qui a été déterminée durant les travaux effectués pour cette thèse. Il est également décrit que plus la concentration d'induction de nisine est élevée

plus la souche produit une activité anti-*L. monocytogenes* importante. Ce phénomène de dose-réponse, observé également dans nos expériences, a été démontré à de nombreuses reprises (KUIPERS *et al.* 1995; RUYTER *et al.* 1996).

IV.1.4 Croissance de la *L. lactis* en condition d'induction

a) Production de dérivés recombinants de la pédiocine en flacon de 250 mL

L'impact des dérivés recombinants de la pédiocine sur la croissance de *L. lactis* a été déterminé en mesurant la vitesse spécifique de croissance et la biomasse finale.

Les souches dérivées de *L. lactis* NZ9000 ont la même vitesse spécifique de croissance et la même biomasse finale, ce qui indique que les dérivés recombinants de la pédiocine n'ont pas d'effet sur la croissance de ces souches.

Il existe une différence de biomasse finale et de vitesse de croissance entre la souche *L. lactis* ML3 subsp. *lactis* et les souches *L. lactis* NZ9000 subsp. *cremoris* produisant des pédiocines recombinantes. Il est décrit que la vitesse de croissance des souches de la sous-espèce *cremoris* est supérieure à celui des souches de la sous-espèce *lactis* (BOQUIEN *et al.* 1988). Il a également été décrit que dans un milieu M17 supplémenté avec du glucose, la biomasse finale de la souche *L. lactis* ML3 (= NCDO 763) est supérieure à celle de la souche *L. lactis* MG1363 (dont dérive la souche *L. lactis* NZ9000) (OBIS *et al.* 2001). En outre, la viabilité des souches de la sous-espèce *lactis* apparaît supérieure à la viabilité des souches de la sous-espèce *cremoris* quand elles sont cultivées dans un milieu M17 supplémenté en glucose à 30°C (KIM *et al.* 1999). Cette augmentation de viabilité peut expliquer les différences de biomasse observées.

b) Production des dérivés recombinants de la pédiocine en fermenteur de 2L

La souche *L. lactis* NZ9000_pSec::h-rpedA produisant la H-Rpédiocine a été cultivée en fermenteur en suivant les recommandations décrites par MIERAU *et al.* 2005, afin d'augmenter sa production globale pour faciliter la purification. Les résultats de productivité ont été comparés à ceux obtenus en flacon de 250 mL. Il semble que la productivité spécifique par gramme de bactérie de la H-Rpédiocine soit 1,8 fois supérieure en flacon qu'en fermenteur. En revanche, la production globale de pédiocine est 1,8 fois supérieure en fermenteur. L'augmentation de la biomasse est une stratégie communément utilisée pour augmenter la production d'une protéine recombinante (RIESENBERG et GUTHKE 1999). La DO_{600nm} finale étant plus importante en fermenteur qu'en flacon de 250 mL, il

est probable que la différence de biomasse soit responsable de la différence de productivité de la H-Rpédiocine.

La biomasse est l'un des principaux facteurs permettant d'augmenter la production globale de protéines recombinantes (RIESENBERG et GUTHKE 1999). L'accumulation de lactate dans le milieu de culture de *L. lactis* est le principal facteur qui stoppe sa croissance (MIERAU 2007 ; RIESENBERG et GUTHKE 1999). Un système de dialyse en ligne permettant d'enlever le lactate du milieu a été développé. Ce système permet d'atteindre une biomasse de 60 g/L (soit une DO_{600nm} de 180 ; MIERAU 2007) et en combinaison avec le promoteur P_{170} inductible au lactate, a permis de produire $2,5 \text{ g/L}^{-1}$ d'une nucléase provenant de *Staphylococcus aureus*. A notre connaissance il n'a jamais été utilisé en combinaison avec le système NICE, qui est l'un des systèmes le plus performant chez *L. lactis* (MORELLO *et al.* 2008). L'utilisation de ce système en combinaison avec le système de dialyse pourrait permettre d'augmenter significativement la production.

IV.1.5 Sécrétion des pédiocines recombinantes

Le système général de sécrétion de *L. lactis* est couramment utilisé pour améliorer la production de protéines recombinantes comme les bactériocines (BORRERO *et al.* 2011a,b ; HERRANZ et DRIESSEN 2005 ; JIMÉNEZ *et al.* 2013 ; LI *et al.* 2011 ; MARTÍN *et al.* 2007a). Pour permettre la sécrétion des protéines recombinantes *via* le système Sec de *L. lactis*, un peptide signal comme celui de la protéine Usp45 peut être fusionnée à l'extrémité N-terminal de la protéine recombinante (MORELLO *et al.* 2008). Il a été décrit dans la littérature qu'une charge positive entre le peptide signal et la protéine recombinante peut avoir un effet négatif sur la sécrétion. Or, la région N-terminale des bactériocines de la sous-classe IIa est positivement chargée, c'est pourquoi les pro-peptides SD et LEISSTCDA ont été insérés entre le SP_{Usp45} et le gène $\Delta_{sp}::pedA$. Il a été montré que les deux pro-peptides permettaient d'augmenter la production de pédiocine recombinante dans les mêmes proportions. Il a déjà été démontré que le peptide SP_{Usp45} combiné avec le pro-peptide LEISSTCDA permettait d'augmenter la productivité de la protéine NucB chez *L. lactis* (LE LOIR *et al.* 1998, 2001). Il est supposé que ce peptide permet une meilleure prise en charge par le système Sec de *L. lactis* ce qui permettrait une sécrétion plus rapide. La rapidité de la sécrétion permettrait alors de diminuer le temps d'exposition aux protéases intracellulaires.

Le pro-peptide LEISSTCDA permet d'accroître sensiblement la productivité : cette constatation conduit à supposer que les charges négatives du pro-peptide LEISSTCDA améliorent l'efficacité de clivage du peptide signal et/ou permettent une conformation du

pré-peptide optimale pour la sécrétion. Cette conformation permettrait à la pré-protéine d'être moins sensible à la dégradation intracellulaire, ce qui permettrait d'augmenter la production globale (LE LOIR *et al.* 2005). Il est probable que les pro-peptides SD et LEISSTCDA aient un mécanisme similaire sur la sécrétion des dérivés recombinants de la pédiocine.

IV.2 Conséquence de la fonctionnalisation en N-terminale sur le potentiel antibactérien des dérivés recombinants de la pédiocine

IV.2.1 Analyse des dérivés recombinants de la pédiocine sur gel de tricine SDS-PAGE

Les surnageants contenant les pédiocines recombinantes ont été analysés sur gel de tricine SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie ou sur gel d'activité en condition non réductrice. Après coloration au bleu de Coomassie, des bandes sont observées (entre 3,5 et 6 kDa) à des masses compatibles avec les masses des dérivés recombinants de la pédiocine : S-Rpédiocine, L-Rpédiocine et Rpédiocine. Sur le gel d'activité correspondant, une activité antibactérienne est observée aux mêmes masses. Pour la S-Rpédiocine une bande à 14,4 kDa est observée. Cette bande correspond à 3 fois la masse de la S-Rpédiocine et pourrait correspondre à un trimère de cette protéine. Une masse de 16,5 kDa a déjà été mesurée pour la pédiocine sauvage par gel filtration à partir d'un échantillon semi-purifié (précipitation au sulfate d'ammonium). Il a été suggéré que cette masse pouvait correspondre à un tétramère (GONZALEZ et KUNKA 1987; RODRÍGUEZ *et al.* 2002). De plus, à forte concentration et à basse température (4°C), la pédiocine PA-1 est connue pour interagir avec les composants des milieux de culture et former des agrégats (RODRÍGUEZ *et al.* 2002), or la précipitation au sulfate d'ammonium des surnageants de culture a été réalisée à 4°C dans des conditions favorisant la formation des agrégats.

Il a été montré que l'interféron α recombinant était produit sous forme de polymères chez *Pichia pastoris*. Ces polymères résultent en partie de la formation de ponts disulfures intermoléculaires induisant la formation d'agrégats (WU *et al.* 2010). Un phénomène semblable peut également être responsable de la bande visible à 14.4 kDa.

IV.2.2 Concentration minimale inhibitrice des dérivés recombinants de la pédiocine

L'impact des pro-peptides SD et LEISSTCDA sur la CMI des dérivés recombinants de la pédiocine a également été évalué. Les résultats montrent que l'insertion de la séquence nucléotidique codant les pro-peptides n'a pas d'effet majeur sur l'activité des dérivés recombinants de la pédiocine. De plus, l'ajout simultané d'une séquence codant un peptide hexa-histidine, d'un site de clivage par l'entérokinase, ainsi que d'un tripeptide charnière à l'extrémité N-terminale ne semble pas avoir d'effet majeur sur l'activité de la H-Rpédiocine. Une étude précédente a démontré que l'ajout d'un résidu lysine en C-terminal de la sakacine P n'avait aucun effet sur l'activité de cette dernière, mais que l'ajout d'une lysine en N-terminal conduisait à une sakacine P ayant une perte d'activité (KAZAZIC *et al.* 2002). Ce résultat indique que l'ajout d'acides aminés en N-terminal d'une bactériocine de la sous-classe IIa peut avoir des effets variables sur son activité. Lorsque l'on greffe des acides aminés en N-terminal d'une bactériocine de la sous-classe IIa, il est donc nécessaire d'évaluer l'impact du greffon sur l'activité de la bactériocine recombinante.

IV.3 Étude du statut des ponts disulfures des dérivés recombinants de la pédiocine

IV.3.1 Purification de la H-Rpédiocine par chromatographie d'affinité

Le statut des ponts disulfures des dérivés de la pédiocine a été analysé par MALDI-TOF. La réalisation de cette expérience a nécessité la production de la pédiocine recombinante en fermenteur, de façon à augmenter la production globale de pédiocine et augmenter le rendement de purification. Pour faciliter la purification d'un dérivé recombinant de la pédiocine directement à partir du surnageant de culture en une étape de chromatographie d'affinité (IMAC), la séquence nucléotidique codant une étiquette histidine a été insérée entre la séquence codant le pro-peptide SD et la séquence nucléotidique codant la pédiocine PA-1. Ce dérivé de la pédiocine est élué lorsqu'une solution contenant 20 mM d'imidazole est injectée dans la colonne ; cela indique qu'il est faiblement retenu dans la colonne de chromatographie.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce phénomène :

1. L'étiquette histidine peut être masquée par la conformation de la protéine ou être

dégradée.

2. Des éléments du surnageant de culture, comme des ions métalliques, peuvent avoir altéré la liaison de la H-Rpédiocine.
3. Le temps d'incubation de la H-Rpédiocine dans la colonne est insuffisant pour qu'elle soit fortement retenue dans la colonne.

Une étude a décrit la purification de l'entéroïne P produite en fusion avec une étiquette histidine à l'extrémité C-terminal. Une étape d'incubation d'une nuit de la protéine recombinante avec une résine d'acide Ni-NTA ont précédé l'étape d'élution (HERRANZ et DRIESSEN 2005). Suggérant que la fixation à la résine est une étape sensible.

IV.3.2 Analyse du statut des ponts disulfures de la H-Rpédiocine

L'analyse du statut des ponts disulfures par MALDI-TOF a révélé que le pont disulfure de la région N-terminale de la H-Rpédiocine n'est pas formé, tandis que le pont disulfure de la région C-terminale semble correctement formé. Le pont de la région C-terminale joue un rôle dans l'activité antibactérienne, ainsi que sur le spectre d'action de la pédiocine (BHUGALOO-VIAL *et al.* 1999 ; FIMLAND *et al.* 2000). Le pont disulfure en N-terminale est conservé chez les bactériocines de la sous-classe IIa et apparaît indispensable au maintien de l'activité de la pédiocine (MILLER *et al.* 1998a). Cependant, il a également été décrit que la pédiocine PA-1 était faiblement active en condition réductrice (EIJSSINK *et al.* 1998). L'absence de ce pont peut donc en partie expliquer la faible activité de la H-Rpédiocine.

Une autre hypothèse expliquant l'activité résiduelle serait que plusieurs isoformes en mélange soient présentes dans le surnageant de culture : certaines ne présenteraient pas de pont disulfure en N-terminal et d'autre en présenteraient un. FIMLAND *et al.* 2000 et JOHNSEN *et al.* 2000 ont isolé deux isoformes de la pédiocine recombinante ayant une faible activité antibactérienne *via* une méthode de RP-HPLC. Ce résultat suggère qu'une seule méthode est insuffisante pour voir l'ensemble des formes de la H-Rpédiocine.

IV.3.3 Recherche d'une protéine responsable de la formation des ponts disulfures de la pédiocine PA-1

Les analyses d'activités ont révélé que les dérivés recombinants de la pédiocine (*i. e.* H-Rpédiocine, S-Rpédiocine, L-Rpédiocine et Rpédiocine) avaient une CMI trente fois plus élevée que la CMI d'une pédiocine sauvage produite par *P. acidilactici*. Il a déjà été montré que les bactériocines pédiocine PA-1, entéroïne A, divercine RV41 et sakacine A étaient

moins actives lorsqu'elles étaient produites de façon hétérologue et sécrétées *via* le système Sec de *L. lactis*. Les hypothèses proposées sont que les bactériocines peuvent s'auto-agréger, être dégradé, être cysteinylées ou être mal conformées (BERMÚDEZ-HUMARÁN *et al.* 2007 ; BORRERO *et al.* 2011a ; JIMÉNEZ *et al.* 2013 ; KUIPERS *et al.* 2006 ; MARTÍN *et al.* 2007a,b). En outre, il a été décrit que des mésappariements des cystéines ont lieu quand la pédiocine est produite de façon hétérologue chez *Lb. sakei*. Ces résultats ont permis d'émettre l'hypothèse qu'il existe une protéine responsable de la formation des ponts disulfures de la pédiocine PA-1 lorsqu'elle est produite chez le producteur naturel (FIMLAND *et al.* 2000 ; JOHNSEN *et al.* 2000). La souche *L. lactis* ML3 a été transformée avec l'ensemble des gènes constituant l'opéron de la pédiocine sous le contrôle du promoteur P_{nisA} . Bien que le surnageant de cette bactérie présente une activité antibactérienne, la pédiocine recombinante produite n'est pas détectable en ELISA. De plus, sur gel de tricine SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie, aucune bande n'est visible à la taille attendue, alors qu'une activité est visible sur le gel d'activité correspondant. Ces deux résultats semblent indiquer que cette souche produit de faible quantité de pédiocine et qu'une différence de structure caractérise la pédiocine produite par une souche ne présentant que *pedA*, et la pédiocine produite par une souche présentant les gènes *pedABCD*. L'analyse de la séquence protéique des quatre protéines constituant l'opéron de la pédiocine a révélé que la protéine PedC possède un domaine thioredoxine avec un site catalytique CXXC caractéristique des protéines impliqués dans la formation de ponts disulfures. L'hypothèse émise est que cette protéine est impliquée dans la formation correcte des ponts disulfures de la pédiocine PA-1.

IV.3.4 Impact de la co-production de PedC sur la productivité spécifique de la pédiocine recombinante et de ses dérivés

Afin d'étudier l'action de la protéine PedC, cette dernière a été co-produite avec les dérivés recombinants Rpédiocine et S-Rpédiocine. En parallèle, les souches produisant ces dérivés de la pédiocine ont été transformées avec le vecteur pOri23. La productivité spécifique des souches *L. lactis* NZ9000_pSec::*rpedA*_pOri::*pedC* et *L. lactis* NZ9000_pSec::*s-rpedA*_pOri::*pedC* est inférieure à la productivité des souches témoins *L. lactis* NZ9000_pSec::*rpedA*_pOri23 et *L. lactis* NZ9000_pSec::*s-rpedA*_pOri23. L'analyse de la séquence de PedC a révélé qu'elle était probablement sécrétée *via* le système Sec. Il est donc envisageable que la pédiocine recombinante et PedC entrent en compétition pour la sécrétion *via* ce système et que le trafic moléculaire entraîne une diminution de la quantité de pédiocine produite.

La productivité spécifique de la souche *L. lactis* NZ9000_pSec::rpedA_pOri23 est inférieure à celle de la souche *L. lactis* NZ9000_pSec::rpedA. Le plasmide pOri23 est maintenu dans la bactérie par ajout d'érythromycine, un inhibiteur de la traduction (HAMILTON-MILLER 1973). La diminution de productivité spécifique de la souche *L. lactis* NZ9000_pSec::rpedA_pOri23 due à l'action de l'érythromycine. Cependant, aucune différence de productivité n'est observée pour les souches *L. lactis* NZ9000_pSec::s-rpedA_pOri23 (Tableau 12) et *L. lactis* NZ9000_pSec::s-rpedA. Cette différence pourrait être expliquée par une meilleure efficacité de traduction de l'ARNm ayant en 5' la séquence codant le pro-peptide SD.

IV.3.5 Effet de la protéine PedC sur l'activité des pédiocines recombinantes

Lorsque les dérivés recombinant de la pédiocine Rpédiocine et S-Rpédiocine sont co-produits avec la protéine PedC, leur CMI est approximativement 2,4 fois moins élevée que lorsqu'elles sont produites en absence de *pedC*. La protéine PedC a précédemment été annotée comme protéine accessoire de transport de bactériocines par homologie de séquence avec la protéine LcnD qui est elle-même un homologue de la protéine HlyD. La protéine HlyD étant nécessaire à la sécrétion de l'haemolysine A, il en a été conclu que la protéine PedC était indispensable à la sécrétion de la pédiocine PA-1 *via* le système de transport dédié chez *P. acidilactici* et *E. coli* (VENEMA *et al.* 1995). Cependant, comme la quantité de pédiocine PA-1 n'a pas été mesurée, il est possible que l'absence d'activité mesurée dans cette étude soit due à une diminution de l'activité spécifique de la pédiocine PA-1 plutôt qu'à une absence de sécrétion. Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'une étude décrit la protéine PedD comme suffisante pour permettre la sécrétion de la pédiocine PA-1 chez *E. coli* (BUKHTIYAROVA *et al.* 1994). Les résultats obtenus pendant cette étude semblent indiquer que la protéine PedC a un rôle sur le potentiel antibactérien de la pédiocine PA-1 plutôt que sur le transport.

L'analyse de la structure de la protéine PedC suggère que c'est une TDOR ayant un rôle dans la formation des ponts disulfures de la pédiocine. Il a été suggéré que les TDOR ayant un site catalytique CXHC (comme DsbA) étaient des oxydases et que les TDOR ayant un site catalytique CXYC (comme DsbC et DsbG) étaient des isomérases (HERAS *et al.* 2008). Le site catalytique potentiel de la protéine PedC est formé des résidus CVHC, suggérant que la protéine PedC est une oxydase.

L'activité d'une TDOR de *Vibrio cholerae* a été évaluée en fonction du pH. Cette étude a permis d'établir que l'activité de cette TDOR était dépendante du pH et que,

à certaine valeur de pH ($\text{pH} < 4,0$), celle-ci est inactive (RUDDOCK *et al.* 1996). Ceci indique que le pH est un facteur important influençant l'activité des TDOR. Une analyse structurale de la protéine PedC permettant de déterminer son mécanisme d'action est donc un prérequis avant une plus large utilisation.

IV.3.6 Recherche d'homologues de la protéine PedC

Une analyse de séquence a révélé que sur les clusters de gènes impliqués dans la biosynthèse d'autres bactériocines de la sous-classe IIa (coaguline A, plantaricine 423, sakacine G, leucocine A, leucocine C et mésentéroïne Y105) se trouvent des gènes codant des protéines homologues de la protéine PedC. Ce résultat suggère que ces protéines ont peut-être un rôle dans l'activité de ces bactériocines de la sous-classe IIa. En outre, deux études ont respectivement démontrées le rôle des TDOR BlpG_{st} et BdbA dans la formation des ponts disulfures de la thermophiline 13 (FONTAINE et HOLS 2008) et de la sublancine 168 (DORENBOS *et al.* 2002). La thermophiline 13 est une bactériocine de la sous-classe IIb, tandis que la sublancine 168 est une bactériocine de la classe IV (OMAN *et al.* 2011). Le rôle des TDOR dans la maturation des bactériocines ne semble pas limité à une classe de bactériocines. Cependant, une interaction directe entre une TDOR et une bactériocine n'a jamais été démontrée à ce jour.

Conclusion générale et perspectives

Dans un premier temps, afin de permettre la sécrétion de la pédiocine recombinante par *L. lactis*, la séquence codant le peptide signal de la protéine Usp45 a été ajoutée à l'extrémité 5' du gène codant la structure mature de la pédiocine. Dans un second temps, pour optimiser la sécrétion, les séquences codant les pro-peptides SD et LEISSTCDA ont été insérées entre la séquence de la pédiocine et celle du peptide signal de la protéine Usp45. L'insertion de la séquence nucléotidique de ces pro-peptides permet une amélioration de la sécrétion sans effet majeur sur l'activité de la pédiocine recombinante. Des analyses indiquent que cette pédiocine est moins active que la pédiocine sauvage. L'analyse *in silico* de l'opéron de la pédiocine a révélé que la protéine PedC code une thiol-disulfide oxydoréductase ayant probablement un rôle dans la formation des ponts disulfures de la pédiocine PA-1. La co-production de cette protéine avec les dérivés recombinants de la pédiocine a permis d'améliorer le pouvoir antibactérien de ces dernières. Ceci suggère que l'expression seule du gène de la pédiocine mature, *via* un hôte d'expression, n'est pas suffisante pour obtenir une activité antibactérienne optimale, et que la protéine PedC permet d'augmenter l'activité de la pédiocine PA-1. Cette protéine pourrait être utilisée pour améliorer le pouvoir antibactérien des bactériocines recombinantes produites de façon hétérologue, probablement en favorisant la production de peptide avec une conformation native des ponts disulfures.

Pour conclure, un système d'expression hétérologue permettant la production et la sécrétion de dérivés recombinants de la pédiocine directement dans le surnageant de culture a été mis au point. Ce système est suffisamment tolérant pour permettre la production de pédiocine modifiée par greffage de peptides en N-terminale. Il pourrait être utilisé pour produire des pédiocines modifiées par d'autres greffons, voire par des protéines. La sécrétion dans le surnageant permettrait alors de s'affranchir d'une étape de purification et ainsi d'évaluer directement l'impact des greffons sur le pouvoir antibactérien de la pédiocine recombinante. Cette expérience permettrait ainsi d'évaluer plus en avant la tolérance de l'extrémité N-terminale de la pédiocine vis-à-vis d'autres greffons. Les résultats obtenus durant cette étude ont démontré que l'extrémité N-terminale de la pédiocine apparaît

suffisamment flexible pour tolérer la greffe de quelques acides aminés. Cette propriété a été utilisée pour améliorer l'efficacité de sécrétion de cette bactériocine *via* le système Sec de *L. lactis*, mais pourrait aussi être utilisée pour ajouter une fonction à la bactériocine afin de mettre au point des composés antibactériens innovants.

Annexe A

Carte des plasmides pSec::*nucB*, pOri23
et de leurs dérivés.

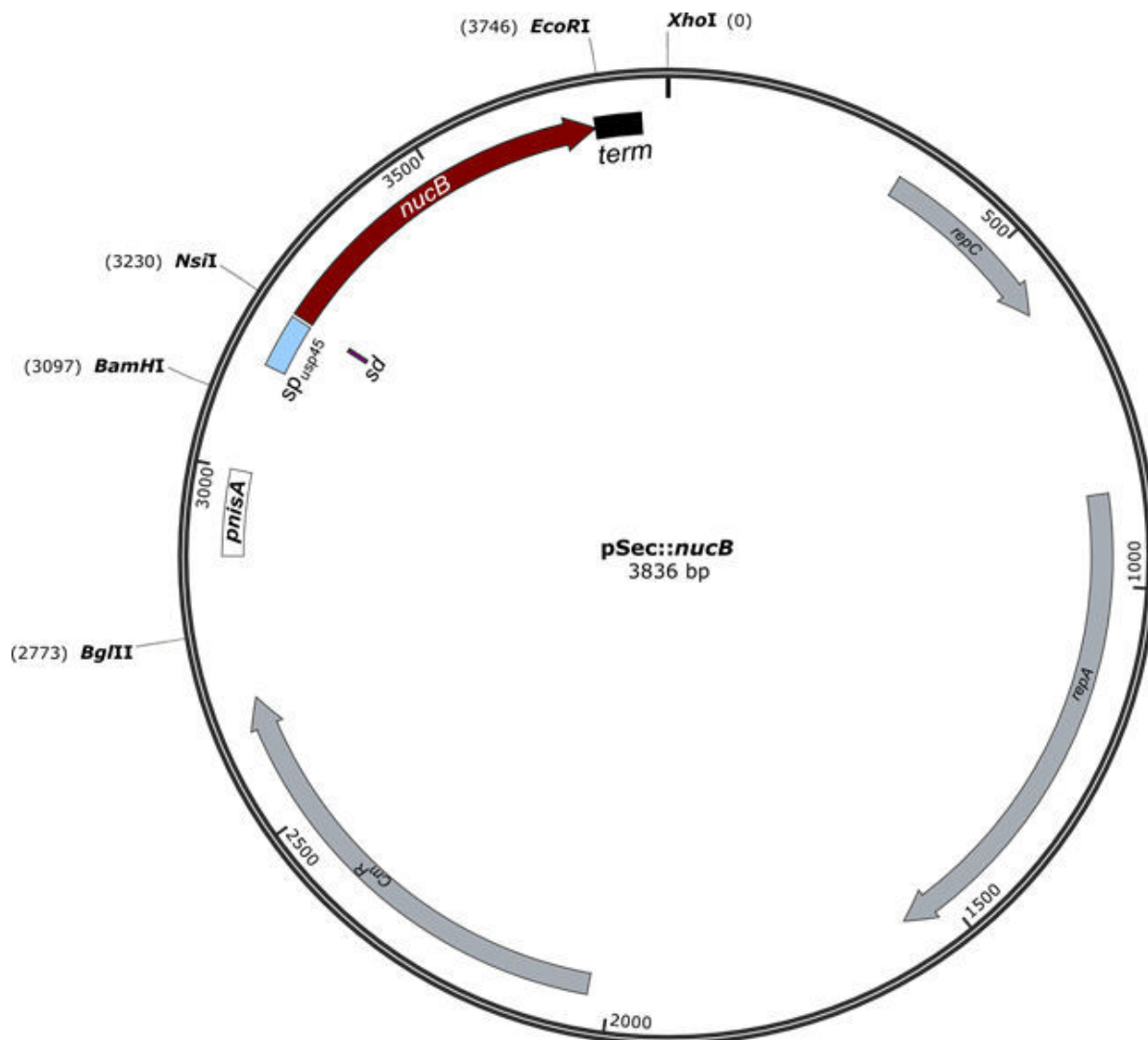


FIGURE A.1 – Plasmide pSec::nucB. Les sites de restriction utilisés pour les clonages sont indiqués. Ce plasmide contient le gène *spusp45* ::*sd*::*nucB* sous le contrôle du promoteur *P_{nisA}* inductible à la nisine A, ainsi que les gènes de répllication *repA* et *repC*, le gène conférant la résistance au chloramphénicol *cm^R*, et un signal de terminaison de la transcription *term*.

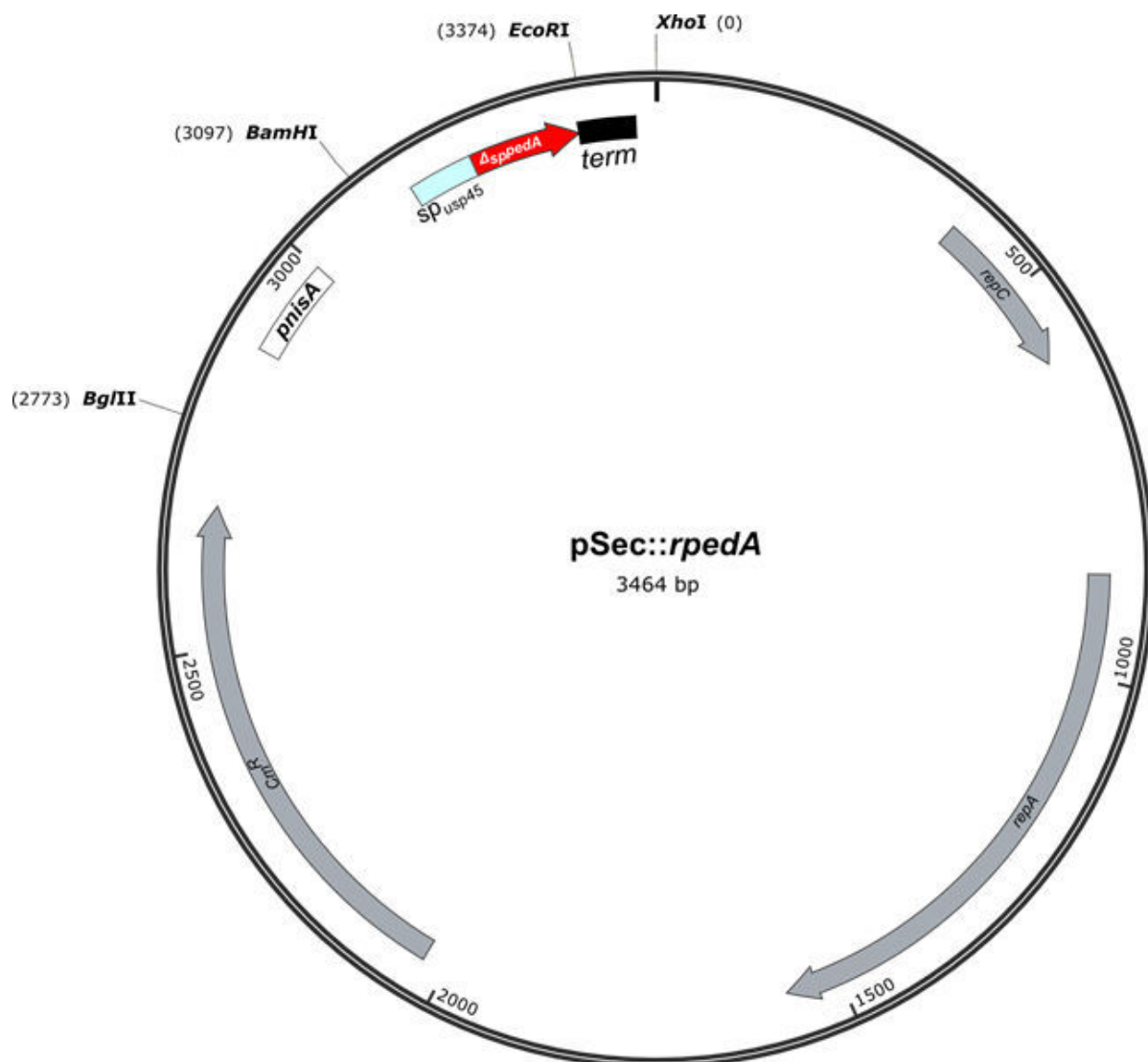


FIGURE A.2 – Plasmide pSec::rpedA. Ce plasmide dérive du plasmide pSec::nucB. Les sites de restriction utilisés pour les clonages sont indiqués. Ce plasmide contient le gène *spusp45* :: Δ_{spedA} sous le contrôle du promoteur P_{nisA} inductible à la nisine A, ainsi que les gènes de répllication *repA* et *repC*, le gène conférant la résistance au chloramphénicol *cm^R*, et un signal de terminaison de la transcription *term*.

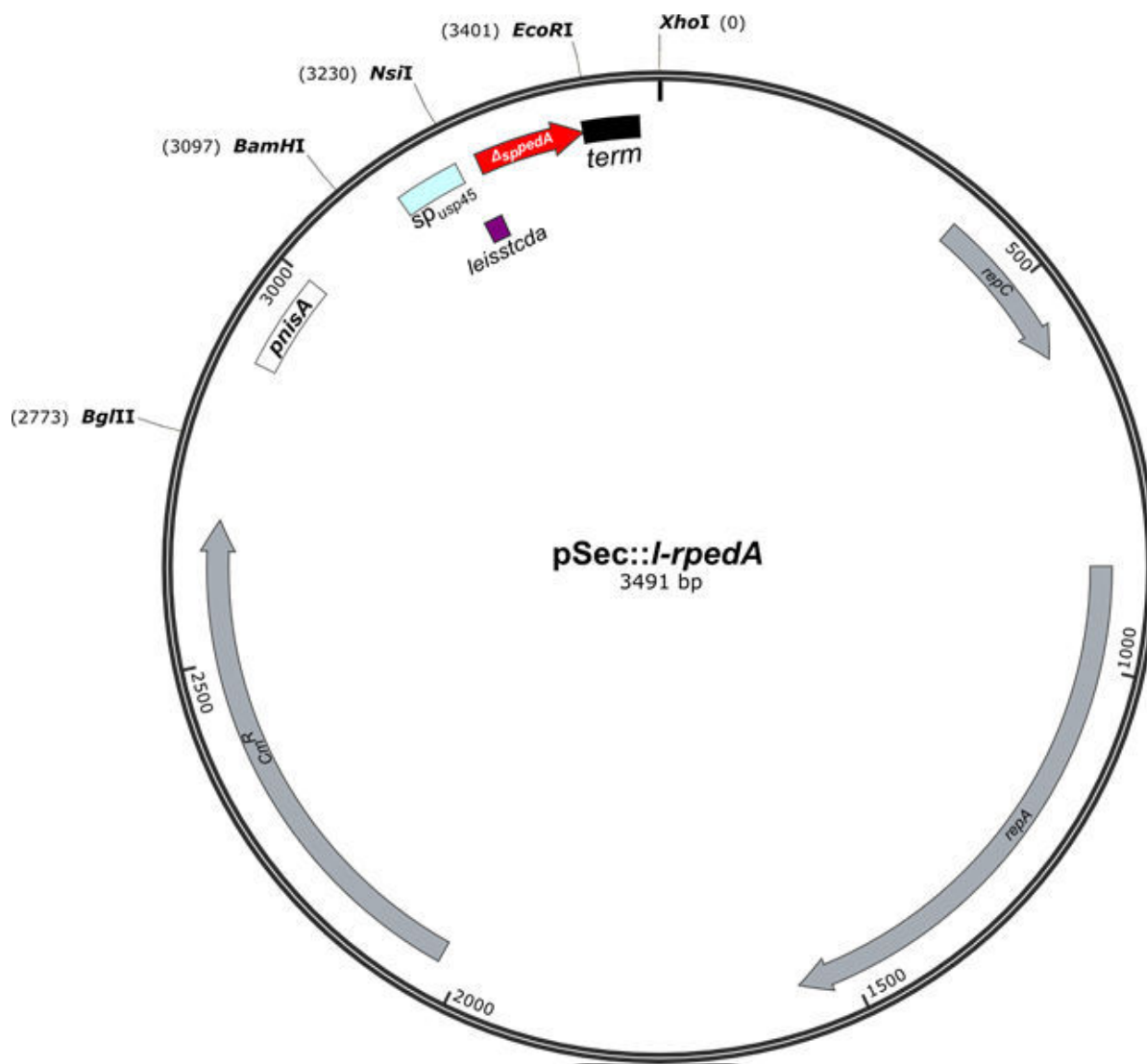


FIGURE A.3 – Plasmide pSec::l-rpedA. Ce plasmide dérive du plasmide pSec::nucB. Les sites de restriction utilisés pour les clonages sont indiqués. Ce plasmide contient le gène *sp_{usp45} ::leisstcda::Δ_{spedaA}* sous le contrôle du promoteur *P_{nisA}* inductible à la nisine A, ainsi que les gènes de réplication *repA* et *repC*, le gène conférant la résistance au chloramphénicol *cm^R*, et un signal de terminaison de la transcription *term*.

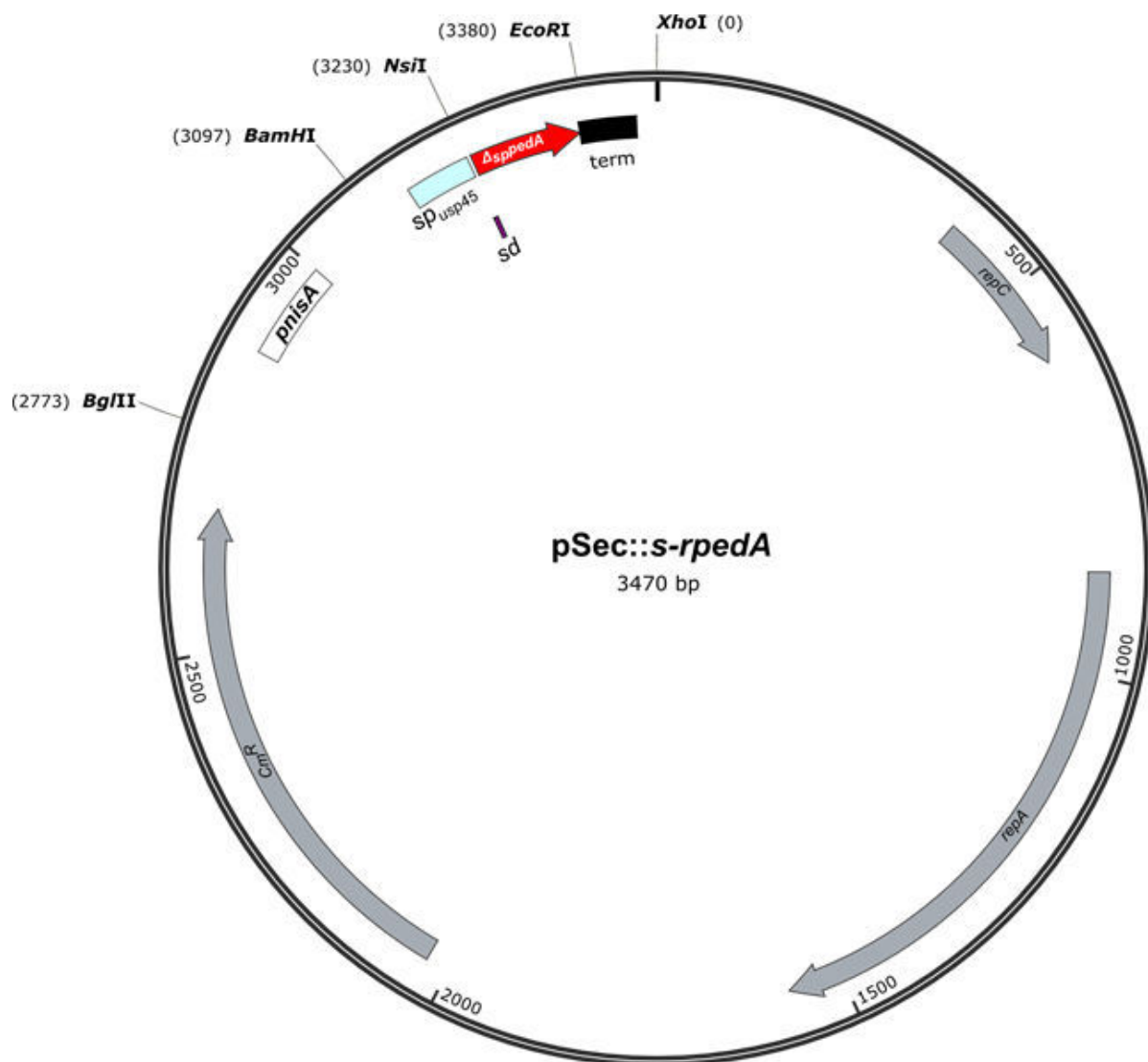


FIGURE A.4 – Plasmide pSec::s-rpedA. Ce plasmide dérive du plasmide pSec::nucB. Les sites de restriction utilisés pour les clonages sont indiqués. Ce plasmide contient le gène *spusp45* ::*sd*:: $\Delta spdpdA$ sous le contrôle du promoteur P_{nisA} inductible à la nisine A, ainsi que les gènes de réplication *repA* et *repC*, le gène conférant la résistance au chloramphénicol *cm^R*, et un signal de terminaison de la transcription *term*.

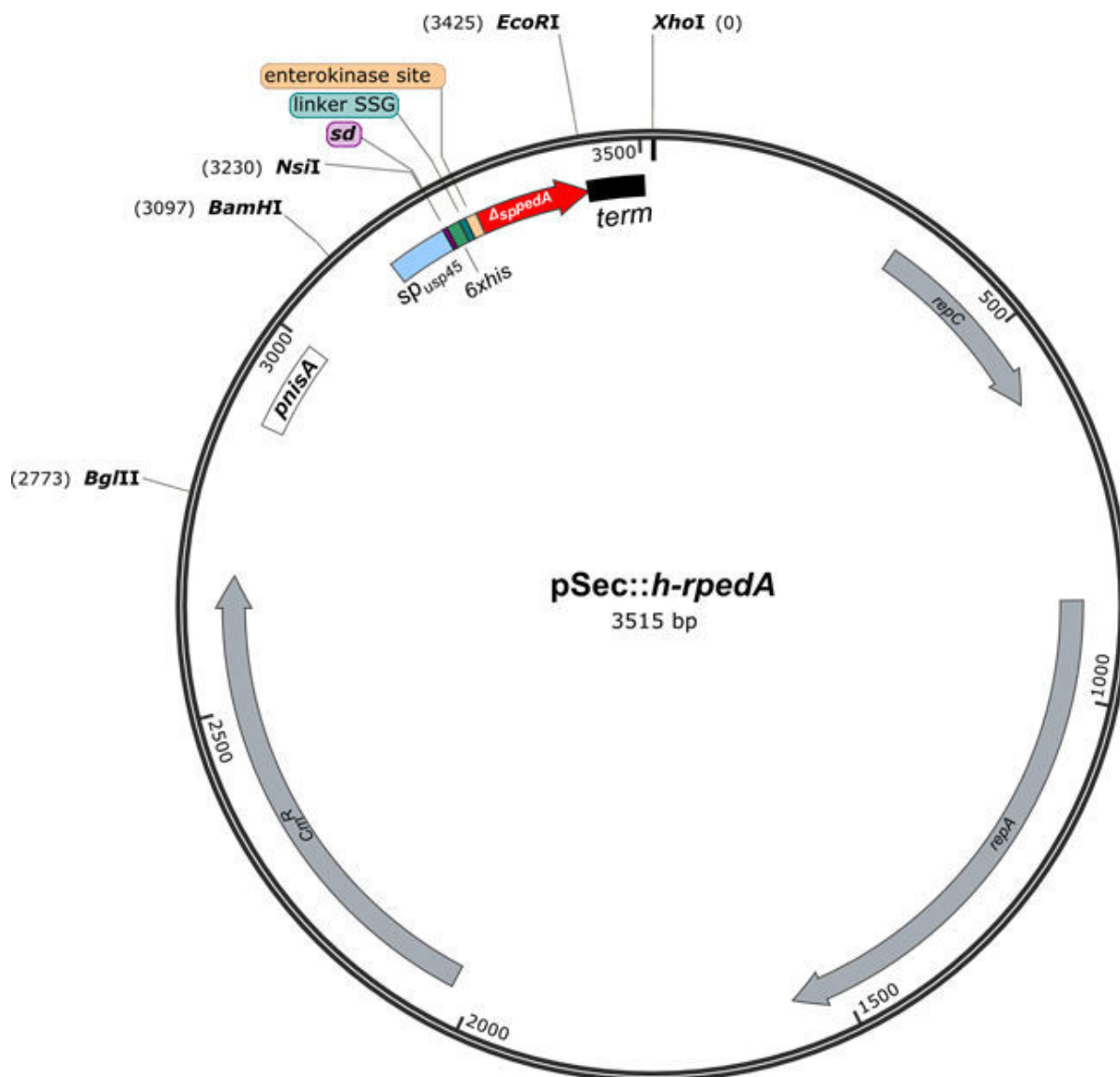


FIGURE A.5 – Plasmide pSec::h-rpedA. Ce plasmide dérive du plasmide pSec::nucB. Les sites de restriction utilisés pour les clonages sont indiqués. Ce plasmide contient le gène *sp_{usp45}::histag::Δsp_{rpedA}* sous le contrôle du promoteur *P_{nisA}* inductible à la nisine A, ainsi que les gènes de répllication *repA* et *repC*, le gène conférant la résistance au chloramphénicol *cm^R*, et un signal de terminaison de la transcription *term*.

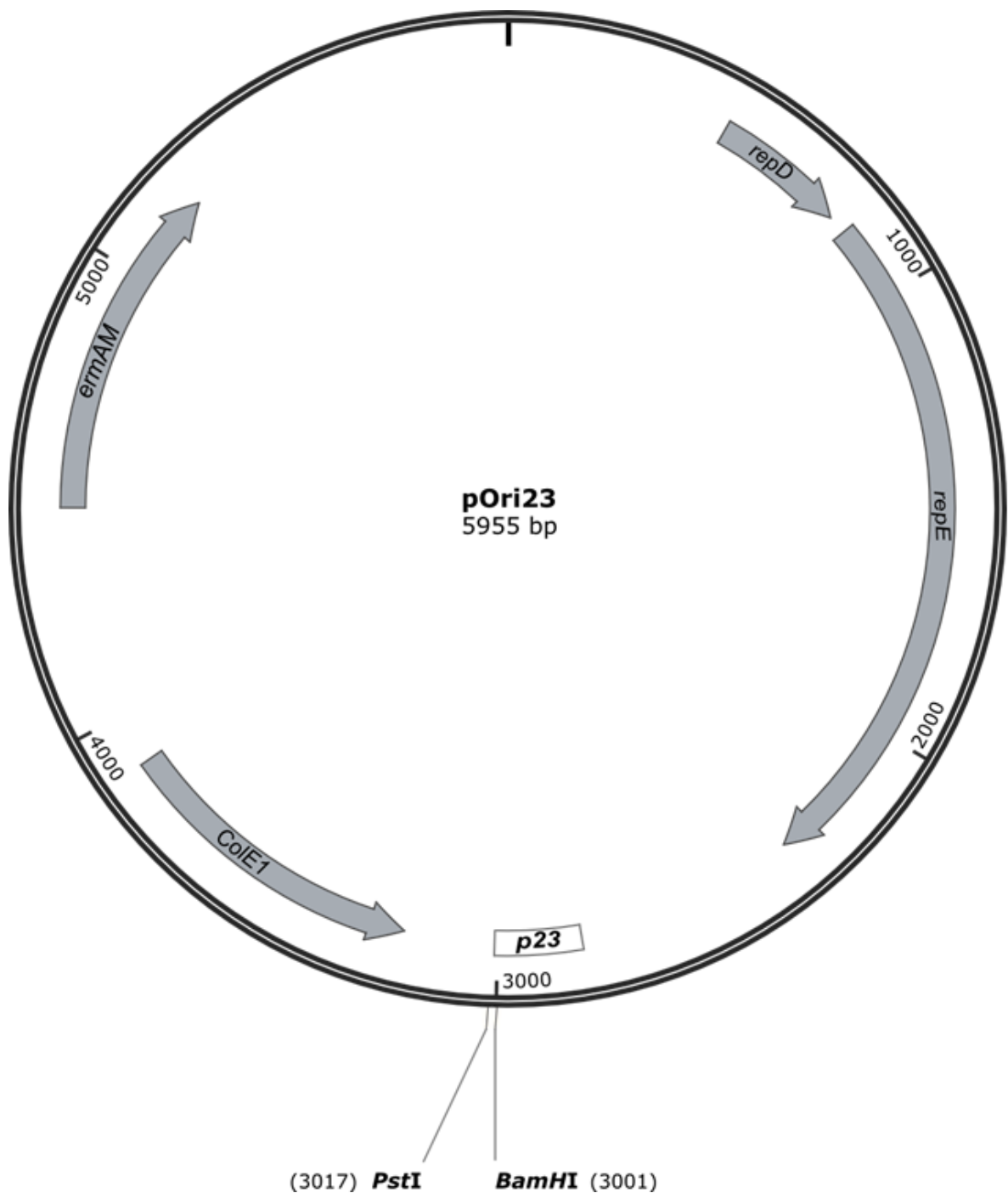


FIGURE A.6 – Plasmide pOri23. Les sites de restriction utilisés pour les clonages sont indiqués. Ce plasmide contient le promoteur constitutif P23, les gènes de réplication *repD* et *repE*, le gène conférant la résistance à l'érythromycine *ermAM*, ainsi que l'origine de réplication *ColE1*.

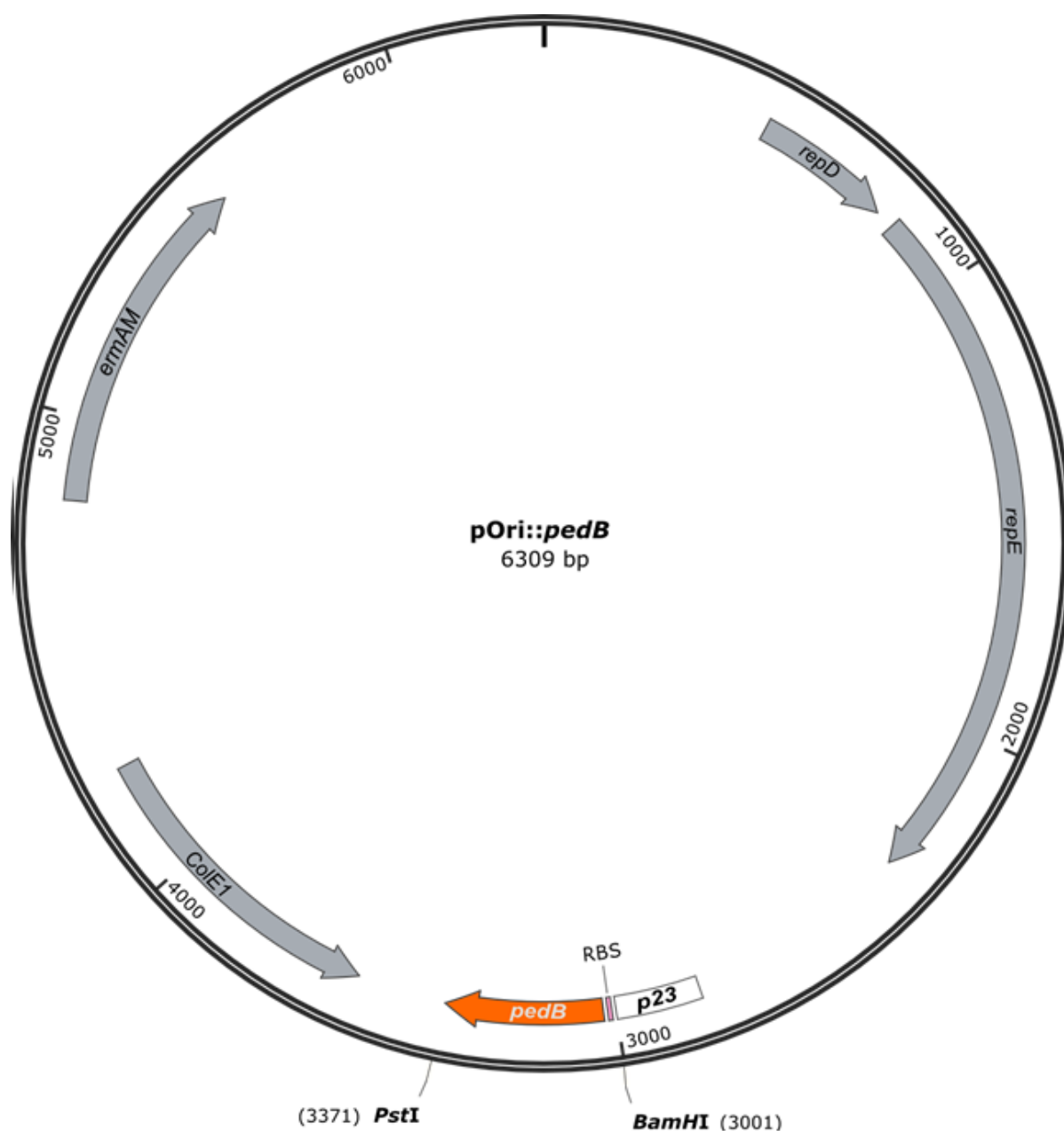


FIGURE A.7 – Plasmide pOri::pedB. Ce plasmide dérive du plasmide pOri23. Les sites de restriction utilisés pour les clonages sont indiqués. Ce plasmide contient le gène *pedB* sous le contrôle du promoteur constitutif P23, une séquence Shine-Dalgarno (RBS), les gènes de réplication *repD* et *repE*, le gène conférant la résistance à l'érythromycine *ermAM*, ainsi que l'origine de réplication *ColE1*.

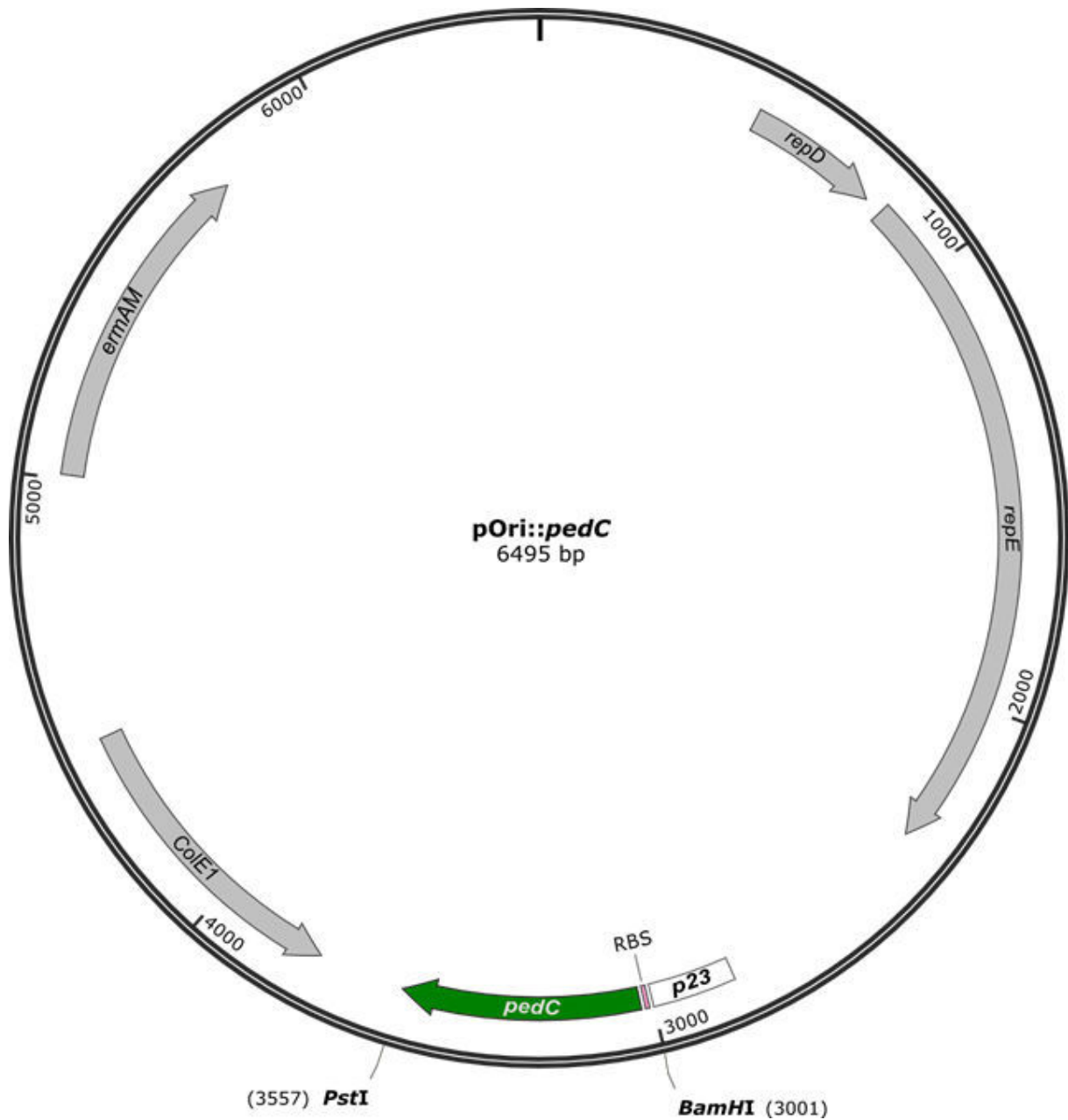


FIGURE A.8 – Plasmide pOri::pedC. Ce plasmide dérive du plasmide pOri23. Les sites de restriction utilisés pour les clonages sont indiqués. Ce plasmide contient le gène *pedC* sous le contrôle du promoteur constitutif P23, une séquence Shine-Dalgarno (RBS), les gènes de répllication *repD* et *repE*, le gène conférant la résistance à l'érythromycine *ermAM*, ainsi que l'origine de répllication *ColE1*.

Annexe B

Combining propeptide fusion and
co-expression with PedC improves
pediocin production in *Lactococcus*
lactis

Combining propeptide fusion and co-expression with PedC improves pediocin production in *Lactococcus lactis*

Alexandre Back¹, Frédéric Borges^{1*}, Cécile Mangavel¹, Cédric Paris¹, Emmanuel Rondags², Romain Kapel², Arnaud Aymes², Hélène Rogniaux³, Marija Pavlović³, Auke J. van Heel⁴, Oscar P. Kuipers⁴, Anne-Marie Revol-Junelles¹, Catherine Cailliez-Grimal¹

¹Université de Lorraine, Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio), ENSAIA, 2 avenue de la Forêt de Haye, 54518 Vandœuvre-lès-Nancy, France

²Université de Lorraine, Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP), CNRS-UMR 7274, 2 avenue de la Forêt de Haye, 54518 Vandœuvre-lès-Nancy, France

³INRA-UR1268 BIA (Biopolymères Interactions Assemblages) - Plate-forme BIBS (Biopolymères, Biologie Structurale), Rue de la Géraudière - BP 71627, 44316 Nantes cedex 3, France

⁴ Department of Molecular Genetics, GBB Institute, University of Groningen, Nijenborgh 7, 9747 Groningen, The Netherlands

*corresponding author:

e-mail: frederic.borges@univ-lorraine.fr

Tel.: +333-83-595883

Fax: 333-83-595804

ABSTRACT

Lactococcus lactis is considered an efficient cell factory for recombinant protein production. It is able to produce and secrete class IIa bacteriocins such as pediocin PA-1 via the general secretion (Sec) pathway. However, the positive charges at the N-terminus of pediocin PA-1 might impair secretion via the Sec secretion pathway and the obtained recombinant pediocin has been described as less potent than the pediocin from the natural producer. The impact of two propeptides on the production yield and on the potency of recombinant pediocins was investigated. The nucleotide sequences encoding the propeptides SD or LEISSTCDA were inserted between the sequence encoding the signal peptide of Usp45 and the structural gene of the mature pediocin PA-1. Both propeptides improved secretion of the recombinant pediocins. Although no major impact on the antibacterial activity of recombinant pediocins was observed, all recombinant bacteriocins produced in *L. lactis* were less potent than wild-type pediocin. Co-expression of the putative thiol-disulfide oxidoreductase PedC, which is encoded by the pediocin PA-1 operon, with the recombinant pediocins allowed to significantly decrease the minimal inhibitory concentration of the produced bacteriocins. To our knowledge, this report shows for the first time that the propeptides SD or LEISSTCDA lead to an improved secretion of recombinant pediocins with apparently no effect on the antibacterial potency and that PedC plays a major role in the potency of pediocin.

Keywords: Pediocin PA-1, *Lactococcus lactis*, Heterologous expression, PedC, Bacteriocin, Thiol-disulfide oxidoreductase.

INTRODUCTION

Bacteriocins from lactic acid bacteria are defined as antimicrobial proteinaceous compounds synthesized by ribosomes (Riley 2009). They are used in food as bio-preservatives and were lately suggested as drug candidates and probiotic promoting factors (Dobson et al. 2012). As bio-preservatives, they can be added to food following three different strategies: *in situ* into fermented food by bacterial culture which constitutes the starter culture, directly in a purified or semi-purified form (e.g. nisin A, nisaplin®, Danisco) and as an ingredient based on a fermentate of a bacteriocin-producing strain (pediocin PA-1, ALTA™ 2431, Quest International) (Cotter et al. 2013). Utilization of bacteriocins as drugs in human or veterinary health have also been considered (Cotter et al. 2013; Lohans and Vederas 2012; van Heel et al. 2011) as exemplified by nisin A which has been licensed for veterinary applications (Cotter et al. 2005). The industrial use of bacteriocins requires efficient downstream and upstream processes. However, low production rate by natural bacterial producers can dramatically impair further application of bacteriocins (Guyonnet et al. 2000; Jack et al. 1996; Jasniewski et al. 2008).

Heterologous expression is an efficient strategy to enhance bacteriocin production yields. The lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* was successfully used to produce bacteriocins (Rodríguez et al. 2003) including pediocin PA-1 (Arqués et al. 2008; Horn et al. 2004; Horn et al. 1999; Horn et al. 1998; Martín et al. 2007; Reviriego et al. 2007; Reviriego et al. 2005), and could therefore be used as a host for large scale production purpose. Besides, due to its Generally Recognized As Safe (GRAS) status, *L. lactis* is an interesting bacterium for *in vivo* delivery of bacteriocins for probiotic purpose (Dobson et al. 2012; Osmanagaoglu et al. 2010; Pontes et al. 2011) or in fermented food (Renye Jr. et al. 2011). Several strategies were explored to produce pediocin PA-1 by heterologous expression in *L. lactis*. One of them consists of cloning the pediocin PA-1 operon *pedABCD*, under the control of the nisin A promoter (Renye and Somkuti 2010). Another strategy, which aim at improving the secretion step and thereby the overall productivity, is to replace the wild-type signal peptide of the recombinant protein by the Usp45 signal peptide (SP_{usp45}) thus allowing secretion of pediocin PA-1 through the Sec pathway (Li et al. 2011). However, although recombinant pediocin PA-1 was successfully produced, little attention has been paid to the fact that the positive charges of pediocin PA-1 might impair secretion through the Sec pathway. Indeed, the study of recombinant protein production in *L. lactis* showed that the insertion of the peptide LEISSTCDA between the signal peptide and the recombinant protein NucB allowed to increase production of NucB from 3 mg/L to 15 mg/L, highlighting the importance of the nature of the amino acids localized immediately after the cleavage site of the signal peptidase (Le Loir et al. 1998; Pontes et al. 2011). The class IIa bacteriocin divercin RV41 was successfully secreted through the Sec pathway with the remaining propeptide SD fused to the bacteriocin at the N-terminus after the cleavage site. This propeptide SD results from the cloning procedure in the *NsiI* restriction site that allows translational fusion between SP_{usp45} and the coding sequence of interest (Bermúdez-Humarán et al. 2007). As previously suggested (Morello et al. 2008), it could be expected that the negative charge of aspartate in the propeptide SD might enhance protein secretion. However, this point as well as the impact of the propeptide SD on the divercin RV41 specific activity have not been investigated.

Pediocin PA-1 is a model class IIa bacteriocin produced by several strains from *Pediococcus* and *Lactobacillus* species. This bacteriocin exhibits antibacterial activity against a wide spectrum of foodborne pathogens and food spoilage gram-positive bacteria (Papagianni and Anastasiadou 2009). As other class IIa bacteriocins, it affects both membrane permeability and membrane potential (Papagianni and Anastasiadou 2009; Rodríguez et al. 2002). Mature pediocin PA-1 is a 44 amino acid peptide containing four cysteine residues involved in two disulfide bonds (Henderson et al. 1992). The pediocin PA-1 operon consists of the four genes named *pedA*, *pedB*, *pedC* and *pedD*, which encode the prepadiocin PA-1, the pediocin PA-1 immunity protein, an accessory export protein and an ABC transporter (involved in the excision of the signal peptide and the secretion of pediocin), respectively (Bukhtiyarova et al. 1994; Venema et al. 1995).

The initial aim of this work was to investigate the impact of the SD and LEISSTCDA insertions on the secretion efficiency and on the specific activity of recombinant pediocins expressed in *L. lactis*. The results obtained during the course of this study prompted us to give interest to the role that might play PedC in the maturation of pediocin PA-1.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, culture conditions and plasmids. Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *L. lactis* NZ9000 was grown at 30°C in M17 (Difco, Sparks, USA) supplemented with 1% (w/v) glucose (GM17 medium). *Carnobacterium maltaromaticum* DSM20730 was grown in Trypton Salt Broth medium (TSB; Biomérieux, Marcy-l'Étoile, France) supplemented with 6 g/L yeast extract (TSBYE) at 30°C. *Lactobacillus plantarum* LMAX which was isolated from HOLDBAC™ *Listeria* (Danisco) was grown in Man, Rogosa and Sharpes medium (MRS, Biokar, Beauvais, France) at 30°C. *L. lactis* NZ9000 transformants were grown in GM17 containing 10 µg/mL chloramphenicol or/and 10 µg/mL erythromycin (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA). *C. maltaromaticum* DSM20730 transformants were grown in TSBYE containing 5 µg/mL chloramphenicol or/and 5 µg/mL of erythromycin.

Electroporation. Electrocompetent *L. lactis* NZ9000 was obtained as previously described (Holo and Nes 1989). For electrocompetent *C. maltaromaticum*, an over-night culture was diluted 10-fold in fresh TSBYE medium and incubated at 30°C until an OD_{600nm} of 0.7 was reached. Then bacteria were harvested by centrifugation at 6,000 g for 15 min. Following three washes in ice-cold 10% glycerol solution, the pellet was resuspended in 1 mL of the same washing solution and stored at -80°C. The electric pulse was delivered with a Gene-Pulser (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA.) set up at 25 µF, 2.1 kV and 200 Ω. Then the suspension was mixed with 4 mL of TSBYE and incubated 4 hours at 30°C prior plating on selective medium containing 5 µg/mL chloramphenicol or/and 5 µg/mL erythromycin.

Plasmid construction. All the PCR products used for cloning purpose were obtained with the oligonucleotide primers (Eurogentec, Seraing, Belgique) described in Table 2 by using the high fidelity thermostable polymerase *Pfx50* (Invitrogen, Carlsbad, USA). The expression vectors pSec::s-*rpda* and pSec::l-*rpda* were constructed by using pSec::nucB as recipient vector. PCR Product PCRSd and PCRLEI (Table 2) were digested with *NsiI* and *EcoRI* (New England Biolabs, Massachusetts, Ipswich, USA) and were ligated into the pSec expression vector previously digested with the same enzymes to generate pSec::s-*rpda* and pSec::l-*rpda* expression vectors, respectively. The plasmid pSec::rpda was constructed by deleting the SD encoding sequence by crossover PCR. To do so, the PCR products named PEDA1 and PEDA2 which flank the SD encoding region, were obtained by using pSec::s-*rpda* as DNA matrix. The product named PEDA3 was obtained by crossover PCR by using PEDA1 and PEDA2 as DNA matrix and was subsequently digested with *BglII* and *XhoI* and cloned into the pSec expression vector previously digested with the same enzymes in order to generate the expression vector pSec::rpda. Plasmid pOri::pedC was obtained by digesting the PCR product PEDC with *BamHI* and *PstI* (FastDigest, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). The plasmid pOri::pedB was constructed similarly by using the primers described in Table 2. All the recombinant plasmids were obtained by using the ligation mixes to electrotransform *L. lactis* NZ9000. The integrity of plasmid inserts was checked by DNA sequencing according to the method of Sanger (GATC-BIOTECH, Konstanz, Germany).

Heterologous expression. For strains containing pSec::nucB or pSec derivatives, a culture incubated for 17 hours was used to inoculate 200 mL of GM17 supplemented with chloramphenicol (10 µg/mL) in a 250 mL flask at an initial OD_{600nm}

of 0.02. Cultures were grown at 100 rpm stirring (Amplitude: 20 mm; Sanyo, Osaka, Japan) and at 30°C. For strains containing both pSec::nucB or derivatives, and pOri23 or derivatives, a culture incubated for 17 hours was used to inoculate 200 mL of GM17 medium supplemented with chloramphenicol (2 µg/mL) and erythromycin (2 µg/mL) in a 250 mL flask at an initial OD_{600nm} of 0.1. For all strains, heterologous production was induced with 100 ng/mL of semi-purified nisin (balance sodium chloride and denatured milk solids containing 2.5% of nisin from Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), when OD_{600nm} reached 0.4 - 0.5. After 24 hours of incubation, cell dry weights were determined gravimetrically. Then the supernatants were collected after centrifugation (5,000 g; 15 min). Each supernatant was neutralized with 6M NaOH, sterilized by microfiltration (0.2 µm) and stored at -20°C. The experiments were independently performed three times.

ELISA. Recombinant pediocin concentrations were measured by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Rabbit serum containing anti-pediocin PA-1 polyclonal antibodies was purchased from Eurogentec (Seraing, Belgique). Goat anti-rabbit IgG antibodies coupled with HorseRadish Peroxidase (HRP) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Between each step described below, the microtiter plate was washed eight times with washing buffer (phosphate buffer saline containing 0.05% of Tween® 20). Microtiter plate wells (Corning Incorporated, New York, USA) were coated overnight at 4°C with 200 µL of filtered culture supernatant containing recombinant pediocins previously diluted with Phosphate Buffer Saline (PBS) when required. Wells were subsequently blocked with 300 µL of skimmed milk (10% w/v in PBS, Régilait, Saint-Martin-Belle-Roche, France) for 1 hour at room temperature. Wells were then incubated with 150 µL of anti-pediocin polyclonal antibodies (1:1,000 in PBS) for 1 h at room temperature, followed by incubation with 100 µL of HRP-labelled goat anti-rabbit IgG (1:2,000 in PBS) for 1 h. Bound secondary antibodies were detected by adding 100 µL of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). The reaction was stopped with 100 µL of 2M H₂SO₄ and absorbance was read at 450 nm. Concentration of recombinant pediocins in the supernatants were extrapolated from a calibration curve constructed using purified pediocin PA-1 from *Pediococcus acidilactici* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) diluted with PBS and were expressed in µM equivalents of pediocin PA-1.

Antimicrobial Assay. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of pediocin PA-1 and recombinant pediocins were determined by well diffusion assay on agar plates (Mathieu et al. 1993) by using the strain *C. maltaromaticum* DSM20730_pSec_pOri23 as indicator. Agar plates were prepared by inoculating agar medium with the indicator strain at a final OD_{600nm} of 0.01. Then 5 mm wells were cut in the agar medium and 25 µL of supernatant or diluted supernatant were added to each well. Plates were incubated at 4°C overnight, then at 30°C for 24 hours and were inspected for the presence of halos of growth inhibition. MIC is defined as the lowest concentration exhibiting a distinct inhibition zone after 24 hours at 30°C.

Sequence analysis. The nucleotide sequence of putative thiol disulfide oxidoreductases were analysed using BLAST (Altschul et al. 1997), SignalP (Nielsen et al. 1997), Conserved Domain Database CDD (Marchler-Bauer et al. 2013; Marchler-Bauer et al. 2007; Marchler-Bauer and Bryant 2004) and Interproscan (Quevillon et al. 2005). The amino acid sequence of PedC (accession number : P37249), BdbA (accession number: P68569), SkgC (accession number: B2LS01), CoaC (accession number: Q9EZB1), PlaC (accession number: Q93FV5), BlpG_{st} (accession number: Q03J39) used for analysis are from Uniprot.

RESULTS

Impact of propeptides on secretion efficiency

The three plasmids pSec::*rp*edA, pSec::*s-rp*edA, and pSec::*l-rp*edA were constructed with the aim to produce three different recombinant pediocins (Figure 1). The three plasmids contain chimeras where *sp_{usp45}*, which encodes the signal peptide of Usp45, was fused to the mature pediocin encoding sequence Δ_{sp} pedA. In the plasmid pSec::*rp*edA, *sp_{usp45}* was directly fused to Δ_{sp} pedA which theoretically leads, after cleavage by the signal peptidase, to the release of a recombinant pediocin (Rpediocin) exhibiting the primary structure of the wild type mature pediocin PA-1. In the plasmids pSec::*s-rp*ed and pSec::*l-rp*ed, the sequences encoding the propeptides SD and LEISSTCDA, respectively, were inserted between *sp_{usp45}* and Δ_{sp} pedA. These plasmids theoretically lead to the secretion of recombinant fusion pediocins PA-1, named S-Rpediocin and L-Rpediocin, that would exhibit the peptide SD and LEISSTCDA at the N-terminus, respectively. The three plasmids were used to transform *L. lactis*, and the resulting strains were cultivated in order to produce the expected recombinant pediocins. The strain *L. lactis* NZ9000_pSec::*nucB* was used as control. This control strain produces an extracellular staphylococcal nuclease (NucB) with no known antibacterial property.

For each producer, a dry weight of 0.3 g/L/OD_{600nm} and a maximal OD_{600nm} of 2.3 was obtained, indicating that all strains approximately produced the same biomass. Furthermore, the specific growth (0.8 h⁻¹) rate was not significantly different between strains. The concentration of each recombinant pediocins was measured by ELISA and the specific production was determined by normalizing pediocin PA-1 concentration to dry weight bacteria (Table 3). The strain *L. lactis* NZ9000_pSec::*rp*edA produced approximately 2.3 ± 0.4 µmol/g of recombinant pediocin whereas the strains *L. lactis* NZ9000_pSec::*s-rp*ed and *L. lactis* NZ9000_pSec::*l-rp*ed produced approximately 3.5 ± 0.2 and 3.2 ± 0.3 µmol/g of pediocin, respectively. The results thus show that the SD and LEISSTCDA propeptides allow a 1.5-fold increase in secreted recombinant pediocin production.

Antibacterial activity

The antibacterial activity of supernatants was assessed by agar-well diffusion assay using *C. maltaromaticum* DSM20730_pSec::*nucB*_pOri23 as target strain. Inhibition areas were obtained from the culture supernatants of the three strains *L. lactis* NZ9000_pSec::*rp*edA, *L. lactis* NZ9000_pSec::*s-rp*edA, and *L. lactis* NZ9000_pSec::*l-rp*edA (Figure 2A, panels 2, 3, and 4). No inhibition was obtained with the culture supernatant of the control strain *L. lactis* NZ9000_pSec::*nucB* (Figure 2A, panel 1). Moreover, no inhibition was observed when the same experiment was carried out with an indicator strain previously transformed with pOri::*pedB*, which confers immunity to pediocin PA-1 (Figure 2B, panels 2, 3, and 4). These results show the three strains *L. lactis* NZ9000_pSec::*s-rp*edA, *L. lactis* NZ9000_pSec::*l-rp*edA, and *L. lactis* NZ9000_pSec::*rp*edA produce active recombinant pediocins. The supernatants containing the recombinant pediocins Rpediocin, S-Rpediocin, and L-Rpediocin exhibited MIC values of 1.5 ± 0.3 µM, 1.2 ± 0.1 µM, and 1.2 ± 0.2 µM (Table 3), respectively. These results show the propeptides SD and LEISSTCDA have no major impact on the MIC value of the supernatants containing recombinant pediocins.

Co-production of PedC with S-Rpediocin

The potency of the recombinant pediocins produced in *L. lactis* was compared to the wild type pediocin produced by *Pediococcus acidilactici*. Surprisingly, the wild-type pediocin PA-1 produced from *P. acidilactici* exhibited a MIC value of 0.05 µM, and was thus approximately thirty times more active than the recombinant pediocins. This result suggests that the structure of recombinant pediocins is different from the wild type pediocin. Although class IIa bacteriocins are described to be non-post-translationally modified, they all exhibit at least one disulfide bond. It was previously described that disulfide bonds are important for the antibacterial activity of pediocin PA-1 (Fimland et al. 2000;

Johnsen et al. 2000). Even if disulfide bond formation can be spontaneous, this is a low and aspecific process that can require enzymatic catalysis in bacteria (Kadokura et al. 2003). It was hypothesized that such enzymes could allow correct formation of disulfide bonds in wild type pediocin PA-1 bacterial producers (Fimland et al. 2000; Johnsen et al. 2000). Lately, it was shown that Thiol-Disulfide Oxidoreductases (TDORs), which belong to the thioredoxin superfamily and are characterized by a conserved CXXC motif, are involved in the posttranslational maturation of the bacteriocins sublancin 168 and BlpG_{st} (Dorenbos et al. 2002; Fontaine and Hols 2008). Interestingly, sequence analysis of the pediocin PA-1 operon *pedABCD* revealed that *pedC* encodes a putative secreted protein with a CXXC motif and a thioredoxin-like fold.

The encoding sequence of *pedC* was cloned into pOri23 and the resulting plasmid was used to transform *L. lactis* NZ9000_pSec::s-*rpda*. In parallel, the same recipient strain was transformed with pOri23 and the resulting strain was used as a control strain. Inhibition assays resulted in broader growth inhibition halos for the strain transformed with pOri::*pedC* (Figure 2C, panel 2) than for the strain transformed with pOri23 (Figure 2C panel 1). Consistently, the MIC value of the recombinant pediocin decreased from $1.2 \pm 0.1 \mu\text{M}$ to $0.4 \pm 0.1 \mu\text{M}$ when PedC was co-expressed with the recombinant pediocin (Table 3). Besides, the strain producing PedC exhibited a 3 times lower specific productivity compared to the control strain (Table 3). These results show that even if lower amount of recombinant pediocin are produced, a higher activity was obtained with strain co-producing the recombinant pediocin and PedC. When the same experiment was carried out with the indicator strain transformed with the pOri::*pedB* plasmid, which encodes the pediocin PA-1 immunity factor, no inhibition was observed (Figure 2D, panels 1 and 2). Furthermore, no inhibition was observed when the control strain *L. lactis* NZ9000_pSec::nucB was transformed with pOri::*pedC*, indicating that PedC does not exhibit detectable antibacterial activity in our experimental conditions (data not shown). These results show that PedC allows to increase the antibacterial potency of the recombinant pediocin S-Rpediocin in *L. lactis*.

PedC homologues as putative antibacterial activity promoting factors of bacteriocins

Previous studies already showed that the TDORs BlpG_{st} and BdbA are involved in disulfide bonds formation of the bacteriocin thermophilin 13 (Fontaine and Hols 2008) and the bacteriocin sublancin 168 (Dorenbos et al. 2002), respectively. BLASTP analysis revealed that BlpG_{st} shares 26% of identity (e-value = 2,00E-008) with PedC, and that BdbA shares 17% of identity (e-value = 4,00E-008) with PedC. Furthermore, BlpG_{st} and PedC both exhibit a thioredoxin-like fold (Interproscan accession number IPR012336) and a bacteriocin transport accessory protein-like fold (Interproscan accession number IPR005985). The proteins SkgC, PlaC, CoaC which are transport accessory proteins of the class IIa bacteriocins sakacin G, plantaricin 423 and coagulin A (Figure 3), respectively, appears to have the same thioredoxin-like fold and the same bacteriocin transport accessory protein-like fold as PedC. Moreover, PedC shares 47% (e-value = 1,00E-056), 99% (e-value = 1,00E-132) and 99% (e-value = 3,00E-132) of identity with SkgC, PlaC and CoaC, respectively. This suggests that SkgC, PlaC and CoaC might enhance the activity of the class IIa bacteriocins sakacin G, plantaricin 423 and coagulin A, respectively.

DISCUSSION

The general secretion (Sec) system of *L. lactis* was widely used to improve secretion of recombinant proteins including bacteriocins (Borrero et al. 2011a; Borrero et al. 2011b; Herranz and Driessen 2005; Jiménez et al. 2013) such as the bacteriocin pediocin PA-1 (Li et al. 2011; Martín et al. 2007). In order to allow secretion via the Sec system in *L. lactis*, the signal peptide of the Usp45 protein SP_{usp45} is commonly fused to the N-terminus of recombinant proteins

(Morello et al. 2008). Since it is thought that positive charges impair secretion through the Sec pathway, sequences encoding SD or LEISSTCDA propeptides were fused to the nucleotide sequence encoding the mature pediocin PA-1 (*Δ_{sp::pedA}*) at the 5' end. Both propeptides allowed the improvement of the production of recombinant pediocins with no marked difference between propeptides SD and LEISSTCDA.

The effect of the signal peptide SP_{usp45} and the propeptide LEISSTCDA were previously described to improve the overall productivity in *L. lactis* (Freitas et al. 2005; Langella and Le Loir 1999; Le Loir et al. 2001; Le Loir et al. 1998; Nouaille et al. 2005; Zhang et al. 2010). The replacement of the signal peptide of NucB by the signal peptide of the major secreted protein Usp45 (SP_{usp45}) increased NucB secretion. It was hypothesized that enhancement of protein secretion resulted from a more efficient recognition of the SP_{usp45} by the Sec secretion machinery of *L. lactis*. Moreover, when the propeptide LEISSTCDA was inserted between SP_{usp45} and NucB, secretion was further improved. The underlying mechanism is still unknown, it is speculated the negative charges of the propeptide LEISSTCDA would increase the cleavage efficiency by signal peptidase and/or would fold into a conformational state that would lead to optimal secretion efficiency. This optimal secretion efficiency would therefore allow the protein precursor to be less sensitive to intracellular degradation or would help to escape intracellular degradation thus increasing the production yield (Le Loir et al. 2005). A similar mechanism could explain the higher productivity of the recombinant pediocins fused to SD or LEISTCDA propeptides.

Propeptides SD and LEISSTCDA did not have any significant impact on the antibacterial specific activity of recombinant pediocin PA-1. Thorough analysis of the impact of additional amino acid residues on specific activity of sakacin P revealed that an extra lysine residue at the C-terminal end had no marked effect on antibacterial activity. However, a lysine residue added at the N-terminus strongly reduced the potency of sakacin P (Kazazic et al. 2002). These results indicates that adding amino acid residues at the N-terminal end of class IIa bacteriocins can have various impacts on their potency and peptide engineering implying peptide fusion at the N-terminus would require checking the impact on antibacterial potency of pediocin-like bacteriocins.

It was shown that all recombinant pediocins in the culture supernatants, including Rpediocin, are less active than the wild type pediocin PA-1 produced by *P. acidilactici*. Similar results were already reported for pediocin PA-1, enterocin A, divercin RV41, and sakacin A and it was hypothesized that recombinant bacteriocins might be subjected to self-aggregation, degradation, or could be misfolded (Bermúdez-Humarán et al. 2007; Borrero et al. 2011a; Jiménez et al. 2013; Martín et al. 2007). Another hypothesis would be linked to the fact that pediocin PA-1 has two disulfide bonds. The disulfide bond at the N-terminus is conserved in class IIa bacteriocins, whereas the disulfide bond at the C-terminus is less conserved and is important for both pediocin PA-1 spectrum and stabilization inside the bacterial membrane (Fimland et al. 2005; Fimland et al. 2000; Fimland et al. 1996). When heterologous production of pediocin PA-1 is performed by using *Lactobacillus sakei*, non-native disulfide bonds are formed (Fimland et al. 2000; Johnsen et al. 2000). We hypothesized that similar cystein mispairing were formed in recombinant pediocin PA-1 produced in *L. lactis*. Sequence analysis of the *pedABCD* operon revealed *pedC* would encode a protein with a putative thioredoxin fold and a CXXC catalytic site, suggesting a probable role in the status of the pediocin PA-1 disulfide bonds. In this study, co-production of PedC and the recombinant pediocin S-Rpediocin led to the production of a bacteriocin with higher potency. Though, PedC is described as an accessory transport protein, it was indeed concluded to be essential for secretion by the dedicated secretion system in both *Pediococci* and *E. coli* (Venema et al. 1995). Nevertheless, since the amount of pediocin PA-1 produced was not measured, it remains unclear whether the absence of activity recorded in this study was due to a decrease of secretion efficiency and/or of potency. In line with this, another study demonstrated that PedD was sufficient to allow secretion of pediocin PA-1 in *E. coli* (Bukhtiyarova et al. 1994). Our results further support that PedC increases the potency of pediocin PA-1. Sequence analyses showed that *pedC* homologous genes are genetically linked to genes

289 encoding the class IIa bacteriocin sakacin G, plantaricin 423 and coagulin A suggesting that TDORs are critical functions
290 for these bacteriocins. Two other studies revealed the role of TDORs in the potency of bacteriocins belonging to other
291 classes: the class VI sublancin 168 (Dorenbos et al. 2002) and the class IIb thermophilin 9 (Fontaine and Hols 2008),
292 suggesting that the role of TDORs in the potency of bacteriocins would be not restricted to one particular class of
293 bacteriocins.

294 When PedC was co-expressed with recombinant pediocin S-Rpediocin, a lower concentration of S-Rpediocin
295 was obtained in the culture supernatant. Sequence analysis of PedC suggested it contains a Sec-dependent signal peptide.
296 In addition, *pedC* is under the control of the strong constitutive promoter p23 (van der Vossen et al. 1987). Therefore, it
297 can be speculated that PedC compete with the recombinant pediocin for the recruitment by the Sec machinery for
298 secretion.

299 This study revealed that the model class IIa bacteriocin pediocin PA-1 is sufficiently flexible to tolerate fusions
300 at the N-terminal end. This property was used here to improve secretion efficiency and could also be used for other
301 purposes such as genetic engineering of innovative antibacterial compounds as previously shown for other bacteriocins
302 (Acuña et al. 2012; Qiu et al. 2003). Moreover, this work revealed that solely expressing the structural gene of class IIa
303 pediocin PA-1 in a heterologous host may not be sufficient to get an optimal antibacterial activity, and that PedC might
304 be helpful to enhance the activity of recombinant bacteriocins, probably by increasing the concentration of correct
305 disulfide bond containing peptides.

306

307 Acknowledgements

308 We thank John Renye Jr. for his valuable help and Luis G. Bermúdez-Humarán for the plasmid pSec::*nucB* and
309 for helpful discussions. We thank Arnaud Khemisti, Myriam Michel, Sylvie Wolff, Laureen Hallez and Alexis Boutillas
310 for technical assistance. We are grateful to Nadine Pavlov, Marianne Lasaulce, Claude Didierjean, Stéphane Delaunay,
311 Raphaël Duval and Bertrand Aigle for helpful discussions during the course of this work.

312

313 References

- Acuña L, Picariello G, Sesma F, Morero RD, Bellomio A (2012) A new hybrid bacteriocin, Ent35–MccV, displays antimicrobial activity against pathogenic Gram-positive and Gram-negative bacteria. *FEBS Open Bio* 2:12–19. doi: 10.1016/j.fob.2012.01.002
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402. doi: 10.111.17.9507
- Arqués JL, Rodríguez JM, Gasson MJ, Horn N (2008) Immunity gene *pedB* enhances production of pediocin PA-1 in naturally resistant *Lactococcus lactis* strains. *J Dairy Sci* 91:2591–2594. doi: 10.3168/jds.2007-0759
- Bermúdez-Humarán LG, Rihakova J, Langella P, Demnerova K, Nazef L, Prévost H, Drider D (2007) Antimicrobial activity of divercin RV41 produced and secreted by *Lactococcus lactis*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 13:259–263. doi: 10.1159/000104756
- Borrero J, Jiménez JJ, Gútiérrez L, Herranz C, Cintas LM, Hernández PE (2011a) Protein expression vector and secretion signal peptide optimization to drive the production, secretion, and functional expression of the bacteriocin enterocin A in lactic acid bacteria. *J Biotechnol* 156:76–86. doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.07.038
- Borrero J, Jiménez JJ, Gútiérrez L, Herranz C, Cintas LM, Hernández PE (2011b) Use of the *usp45* lactococcal secretion signal sequence to drive the secretion and functional expression of enterococcal bacteriocins in *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:131–143. doi: 10.1007/s00253-010-2849-z
- 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.
- Cotter PD, Hill C, Ross RP (2005) Bacteriocins: Developing innate immunity for food. Nat Rev Microbiol 3:777–788. doi:10.1038/nrmicro1273
- Cotter PD, Ross RP, Hill C (2013) Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? Nat Rev Microbiol 11:95–105. doi: 10.1038/nrmicro2937
- Dobson A, Cotter PD, Ross RP, Hill C (2012) Bacteriocin production: a probiotic trait? Appl Environ Microbiol 78:1–6. doi: 10.1038/nrmicro2937
- Dorenbos R, Stein T, Kabel J, Bruand C, Bolhuis A, Bron S, Quax WJ, Van Dijk JM (2002) Thiol-disulfide oxidoreductases are essential for the production of the lantibiotic sublancin 168. J Biol Chem 277:16682–16688. doi: 10.1074/jbc.M201158200
- Fimland G, Blingsmo OR, Sletten K, Jung G, Nes IF, 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 MB, Nes IF, Eijsink VG, 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. doi: 10.1128/JB.182.9.2643-2648.2000
- 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. doi: 10.1002/psc.699
- Fontaine L, Hols P (2008) The inhibitory spectrum of thermophilin 9 from *Streptococcus thermophilus* LMD-9 depends on the production of multiple peptides and the activity of BlpG(St), a thiol-disulfide oxidase. Appl Environ Microbiol 74:1102–1110. doi:10.1128/AEM.02030-07
- Freitas DA, Leclerc S, Miyoshi A, Oliveira SC, Sommer PSM, Rodrigues L, Correa Junior A, Gautier M, Langella P, Azevedo VA, Le Loir Y (2005) Secretion of Streptomyces tendae antifungal protein 1 by *Lactococcus lactis*. Braz J Med Biol Res 38:1585–1592. doi: 10.1590/S0100-879X2005001100004
- Guyonnet D, Fremaux C, Cenatiempo Y, Berjeaud JM (2000) Method for Rapid Purification of Class IIa Bacteriocins and Comparison of Their Activities. Appl Environ Microbiol 66:1744–1748. doi: 10.1128/AEM.66.4.1744-1748.2000
- Henderson JT, Chopko AL, van Wassenaar PD (1992) Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. Arch Biochem Biophys 295:5–12. doi: 10.1016/0003-9861(92)90480-K
- Herranz C, Driessen AJM (2005) Sec-Mediated Secretion of Bacteriocin Enterocin P by *Lactococcus lactis*. Appl Environ Microbiol 71:1959–1963. doi: 10.1128/AEM.71.4.1959-1963.2005
- Hui SF, Holt RA, Sriranganathan N, Seidler RJ, Fryer JL (1984) *Lactobacillus piscicola*, a New Species from Salmonid Fish. Int J Syst Bacteriol 34:393–400. doi: 10.1099/00207713-34-4-393
- Holo H, Nes IF (1989) High-Frequency Transformation, by Electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. cremoris Grown with Glycine in Osmotically Stabilized Media. Appl Environ Microbiol 55:3119–3123.
- Horn N, Fernández A, Dodd HM, Gasson MJ, Rodríguez JM (2004) Nisin-controlled production of pediocin PA-1 and colicin V in nisin- and non-nisin-producing *Lactococcus lactis* strains. Appl Environ Microbiol 70:5030–5032. doi: 10.1128/AEM.70.8.5030-5032.2004
- Horn N, Martínez MI, Martínez JM, Hernández PE, Gasson MJ, Rodríguez JM, Dodd HM (1999) Enhanced Production of Pediocin PA-1 and Coproduction of Nisin and Pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*. Appl Environ Microbiol 65:4443–4450.
- Horn N, Martínez MI, Martínez JM, Hernández PE, Gasson MJ, Rodríguez JM, Dodd HM (1998) Production of

- Jack RW, Wan J, Gordon J, Harmark K, Davidson BE, Hillier AJ, Wettenhall RE, Hickey MW, Coventry MJ (1996) Characterization of the chemical and antimicrobial properties of piscicollin 126, a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* JG126. Appl Environ Microbiol 62:2897–2903.
- Jasniewski J, Cailliez-Grimal C, Gelhaye E, Revol-Junelles A-M (2008) Optimization of the production and purification processes of carnobacteriocins Cbn BM1 and Cbn B2 from *Carnobacterium maltaromaticum* CP5 by heterologous expression in *Escherichia coli*. J Microbiol Methods 73:41–48. doi: 10.1016/j.mimet.2008.01.008.
- Jiménez JJ, Borrero J, Diep DB, Gútiérrez L, Nes IF, Herranz C, Cintas LM, Hernández PE (2013) Cloning, production, and functional expression of the bacteriocin sakacin A (SakA) and two SakA-derived chimeras in lactic acid bacteria (LAB) and the yeasts *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis*. J Ind Microbiol Biotechnol 40:977–993. doi: 10.1007/s10295-013-1302-6
- 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. doi: 10.1128/AEM.66.11.4798-4802.2000
- Kadokura H, Katzen F, Beckwith J (2003) Protein disulfide bond formation in prokaryotes. Annu Rev Biochem 72:111–135. doi: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161459
- 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. Microbiol Read Engl 148:2019–2027.
- Kuipers OP, de Ruyter PGG., Kleerebezem M, de Vos WM (1998) Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. J Biotechnol 64:15–21.
- Langella P, Le Loir Y (1999) Heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*: a novel antigen delivery system. Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Médicas E Biológicas Soc Bras Biofísica AI 32:191–198.
- Le Loir Y, Azevedo V, Oliveira SC, Freitas DA, Miyoshi A, Bermúdez-Humarán LG, Nouaille S, Ribeiro LA, Leclercq S, Gabriel JE, Guimaraes VD, Oliveira MN, Charlier C, Gautier M, Langella P (2005) Protein secretion in *Lactococcus lactis* : an efficient way to increase the overall heterologous protein production. Microb Cell Factories 4:2. doi: 10.1186/1475-2859-4-2
- Le Loir Y, Gruss A, Ehrlich SD, Langella P (1998) A nine-residue synthetic propeptide enhances secretion efficiency of heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. J Bacteriol 180:1895–1903. doi:10.1186/1475-2859-4-2
- Le Loir Y, Nouaille S, Commissaire J, Brétigny L, Gruss A, Langella P (2001) Signal peptide and propeptide optimization for heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*. Appl Environ Microbiol 67:4119–4127. doi: 10.1128/AEM.67.9.4119–4127.2001
- Li R, Takala TM, Qiao M, Xu H, Saris PEJ (2011) Nisin-selectable food-grade secretion vector for *Lactococcus lactis*. Biotechnol Lett 33:797–803. doi: 10.1007/s10529-010-0503-6
- Lohans CT, Vederas JC (2012) Development of Class IIa Bacteriocins as Therapeutic Agents. Int J Microbiol 2012:386410. doi: 10.1155/2012/386410
- Marchler-Bauer A, Anderson JB, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Gonzales NR, Gwadz M, Hao L, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Krylov D, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Lu F, Lu S, Marchler GH, Mullokandov M, Song JS, Thanki N, Yamashita RA, Yin JJ, Zhang D, Bryant SH (2007) CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. Nucleic Acids Res 35:D237–D240. doi: 10.1093/nar/gkl951
- Marchler-Bauer A, Bryant SH (2004) CD-Search: protein domain annotations on the fly. Nucleic Acids Res 32:W327–W331. doi: 10.1093/nar/gkh454
- Marchler-Bauer A, Zheng C, Chitsaz F, Derbyshire MK, Geer LY, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, Hurwitz DI,

- Lanczycki CJ, Lu F, Lu S, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Yamashita RA, Zhang D, Bryant SH (2013) CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure. *Nucleic Acids Res* 41:D348–D352. doi: 10.1093/nar/gks1243
- Martín M, Gutiérrez J, Criado R, Herranz C, Cintas LM, Hernández PE (2007) Chimeras of mature pediocin PA-1 fused to the signal peptide of enterocin P permits the cloning, production, and expression of pediocin PA-1 in *Lactococcus lactis*. *J Food Prot* 70:2792–2798.
- Mathieu F, Michel M, Lefebvre G (1993) Properties of a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* CP5. *Biotechnol Lett* 15:587–590. doi: 10.1007/BF00138545
- Morello E, Bermúdez-Humarán LG, Llull D, Solé V, Miraglio N, Langella P, Poquet I (2008) *Lactococcus lactis*, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion. *J Mol Microbiol Biotechnol* 14:48–58. doi: 10.1159/000106082
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 10:1–6. doi: 10.1093/protein/10.1.1
- Nouaille S, Bermúdez-Humarán LG, Adel-Patient K, Commissaire J, Gruss A, Wal JM, Azevedo V, Langella P, Chatel JM (2005) Improvement of bovine *beta*-lactoglobulin production and secretion by *Lactococcus lactis*. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Médicas E Biológicas Soc Bras Biofísica A1* 38:353–359. doi: /S0100-879X2005000300005
- Osmanagaoglu O, Kiran F, Ataoglu H (2010) Evaluation of *in vitro* Probiotic Potential of *Pediococcus pentosaceus* OZF Isolated from Human Breast Milk. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2:162–174. doi: 10.1007/s12602-010-9050-7
- Papagianni M, Anastasiadou S (2009) Pediocins: The bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications. *Microb Cell Factories* 8:3. doi: 10.1186/1475-2859-8-3
- Pontes DS, de Azevedo MSP, Chatel J-M, Langella P, Azevedo V, Miyoshi A (2011) *Lactococcus lactis* as a live vector: Heterologous protein production and DNA delivery systems. *Protein Expr Purif* 79:165–175. doi: 10.1016/j.pep.2011.06.005.
- Qiu X-Q, Wang H, Lu X-F, Zhang J, Li S-F, Cheng G, Wan L, Yang L, Zuo J-Y, Zhou Y-Q, Wang H-Y, Cheng X, Zhang S-H, Ou Z-R, Zhong Z-C, Cheng J-Q, Li Y-P, Wu GY (2003) An engineered multidomain bactericidal peptide as a model for targeted antibiotics against specific bacteria. *Nat Biotechnol* 21:1480–1485. doi: 10.1038/nbt913
- Que YA, Haeffliger JA, Francioli P, Moreillon P (2000) Expression of *Staphylococcus aureus* clumping factor A in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* using a new shuttle vector. *Infect Immun* 68:3516–3522. doi: 10.1128/IAI.68.6.3516-3522.2000
- Quevillon E, Silventoinen V, Pillai S, Harte N, Mulder N, Apweiler R, Lopez R (2005) InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Res* 33:W116–W120. doi: 10.1093/nar/gki442
- Renye JA Jr, Somkuti GA (2010) Nisin-induced expression of pediocin in dairy lactic acid bacteria. *J Appl Microbiol* 108:2142–2151. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04615.x
- Renye Jr. JA, Somkuti GA, Garabal JI, Du L (2011) Heterologous production of pediocin for the control of *Listeria monocytogenes* in dairy foods. *Food Control* 22:1887–1892. doi: 10.1016/j.foodcont.2011.04.031
- Reviriego C, Fernández A, Horn N, Rodríguez E, Marín ML, Fernández L, Rodríguez JM (2005) Production of pediocin PA-1, and coproduction of nisin A and pediocin PA-1, by wild *Lactococcus lactis* strains of dairy origin. *Int Dairy J* 15:45–49. doi: 10.1016/j.idairyj.2004.05.003
- Reviriego C, Fernández L, Kuipers OP, Kok J, Rodríguez JM (2007) Enhanced production of pediocin PA-1 in wild nisin- and non-nisin-producing *Lactococcus lactis* strains of dairy origin. *Int Dairy J* 17:574–577. doi: 10.1016/j.idairyj.2006.05.013

- Riley MA (2009) Bacteriocins, Biology, Ecology, and Evolution. In: Moselio Schaechter (ed) *Encycl. Microbiol.* Third Ed. Academic Press, Oxford, pp 32–44
- Rodríguez JM, Martínez MI, Horn N, Dodd HM (2003) Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 80:101–116. doi: 10.1016/S0168-1605(02)00153-8
- Rodríguez JM, Martínez MI, Kok J (2002) Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Crit Rev Food Sci Nutr* 42:91–121. doi: 10.1080/10408690290825475
- Van der Vossen JM, van der Lelie D, Venema G (1987) Isolation and characterization of *Streptococcus cremoris* Wg2-specific promoters. *Appl Environ Microbiol* 53:2452–2457. doi: 0099-2240/87/102452-06\$02.00/0
- Van Heel AJ, Montalban-Lopez M, Kuipers OP (2011) Evaluating the feasibility of lantibiotics as an alternative therapy against bacterial infections in humans. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 7:675–680. doi: 10.1517/17425255.2011.573478
- Venema K, Kok J, Marugg JD, Toonen MY, Ledebroer AM, Venema G, Chikindas ML (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. doi: 10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17030515.x
- Zhang Q, Zhong J, Liang X, Liu W, Huan L (2010) Improvement of human interferon *alpha* secretion by *Lactococcus lactis*. *Biotechnol Lett* 32:1271–1277. doi: 10.1007/s10529-010-0285-x

Tables:

Table 1. Strains, plasmids and synthetic genes used in this study

Plasmid, Strain and Synthetic genes	Description	Reference
Strains		
<i>L. lactis</i> NZ9000	MG1363 derivative; <i>pepN::nisRK+</i>	(Kuipers et al. 1998)
<i>C. maltaromaticum</i> DSM20730 ^a	Pediocin sensitive strain	(Hiu et al. 1984)
<i>Lb plantarum</i> LMAX	Natural pediocin producer, isolated from HOLDBAC® <i>Listeria</i>	Danisco
<i>L. lactis</i> NZ9000_pSec:: <i>nucB</i>	Carry the plasmid pSec which contains the <i>nucB</i> gene under the control of P _{nisA}	This study
<i>L. lactis</i> NZ9000_pOri:: <i>pedB</i>	Carry the plasmid pOri:: <i>pedB</i> which contains the <i>pedB</i> gene under the control of P23	This study
<i>L. lactis</i> NZ9000_pSec:: <i>rpda</i>	Carry the plasmid pSec:: <i>rpda</i> which contains the <i>Δ_{spda}rpda</i> gene under the control of P _{nisA} .	This study
<i>L. lactis</i> NZ9000_pSec:: <i>s-rpda</i>	Carry the plasmid pSec:: <i>s-rpda</i> which contains the <i>sd::Δ_{spda}rpda</i> gene under the control of P _{nisA}	This study
<i>L. lactis</i> NZ9000_pSec:: <i>l-rpda</i>	Carry the plasmid pSec:: <i>l-rpda</i> which contains the <i>leisstcda::Δ_{spda}rpda</i> gene under the control of P _{nisA}	This study
<i>L. lactis</i> NZ9000_pSec_pOri:: <i>pedC</i>	Carry the plasmid pSec which contains the <i>nucB</i> gene under the control of P _{nisA} and pOri:: <i>pedC</i> which contains the <i>pedC</i> gene under the control of P23.	This study
<i>L. lactis</i> NZ9000_pSec:: <i>s-rpda</i> _pOri23	Carry the plasmid pSec:: <i>s-rpda</i> which contains the <i>sd::Δ_{spda}rpda</i> under the control of P _{nisA} and the plasmid pOri23	
<i>L. lactis</i> NZ9000_pSec:: <i>s-rpda</i> _pOri:: <i>pedC</i>	Carry the plasmid pSec:: <i>s-rpda</i> which contains the <i>sd::Δ_{spda}rpda</i> under the control of P _{nisA} and pOri:: <i>pedC</i> which contains the <i>pedC</i> gene under the control of P23.	This study
<i>C. maltaromaticum</i> DSM20730_pSec:: <i>nucB</i> _pOri23	Pediocin sensitive strain resistant to erythromycin and chloramphenicol	This study
Plasmids		
pSec:: <i>nucB</i>	CmR, P _{nisA} , <i>spusp45</i> , <i>nucB</i> , <i>repA</i> , <i>repC</i>	(Bermúdez-Humarán et al. 2007)
pOri23	ErmR, p23, <i>repD</i> , <i>repE</i>	(Que et al. 2000)
pOri:: <i>pedB</i>	ErmR, p23, pOri23 derivative carrying <i>pedB</i>	This study
pSec:: <i>rpda</i>	CmR, pSec derivative carrying <i>spusp45::rpda</i> and encoding secreted Rpediocin	This study
pSec:: <i>s-rpda</i>	CmR, pSec: derivative carrying <i>spusp45::s-rpda</i> and encoding secreted S-Rpediocin	This study
pSec:: <i>l-rpda</i>	CmR, pSec derivative carrying <i>spusp45::l-rpda</i> and encoding secreted L-Rpediocin	This study
pOri:: <i>pedC</i>	ErmR, p23, pOri23 derivative carrying <i>pedC</i>	This study
Synthetic genes		
Amino acid sequence		
<i>sd::Δ_{spda}rpda</i>	^b tctgataa atattatggtaatggagttactgtggaaacattcatgttctgtgattggggtaaagctacaactgtattattaataatggagctatggcgtactgtggacatcaaggtatcataaatgttaa	Genscript
<i>leisstcda::Δ_{spda}rpda</i>	^b ttagaaatttcatcaacatgtgatgct aatattatggtaatggagttactgtggaacattcatgttctgtgattggggtaaagctacaactgtattattaataatggagctatggcgtactgtggacatcaaggtatcataaatgttaa	Genscript

^aThe strain was from *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* collection.

^bThe nucleotide sequences encoding propeptides SD and LEISSTCDA fused to the N-terminus of pediocin PA-1 are in bold.

Table 2. Primers and PCR products

PCR product name	Matrix	Primers ^a
PEDB	<i>Lb. plantarum</i> LMAX	Forward : ATCG GGATC CTAA AAA <i>AGGGAGGCC</i> AAATATAATGAATAAGACTAAGTCGGAA Reverse : ATCG CTGCAG CTATTGGCTAGGCCACGT
PCRS	<i>sd::ΔspedA</i>	Forward: CCCCCCCC ATGCAT CTGATAAATATTATGGTAATGGAGTTACTTGTGGA Reverse : CCCCC GAATTC ACTAGTCCTTAACATTTATGATTACCTTG
PCRLEI	<i>leisstcda::ΔspedA</i>	Forward : CCCCCCCC ATGCAT TAGAAATTTTCATCAACATGTGATGCTAAATAT Reverse : CCCCC GAATTC ACTAGTCCTTAACATTTATGATTACCTTG
PEDA1	pSec::s- <i>rpedA</i>	Forward : ACAGCTCCAAGATCTAGTCTT Reverse : AGTAACTCCATTACCATAATATTTGCATAAACACCTGACAACGG
PEDA2	pSec::s- <i>rpedA</i>	Forward : CCGTTGTCAGGTGTTTATGCAAAATATTATGGTAATGGAGTTACT Reverse : ACATGCTGAAGAGCATCTCATT
PEDA3	PEDA1 and PEDA2	Forward : ACAGCTCCAAGATCTAGTCTT Reverse : ACATGCTGAAGAGCATCTCATT
PEDC	<i>Lb. plantarum</i> LMAX	Forward : GGGGGG GGATC CTAA AAA <i>AGGGAGGCC</i> AAATATAATGTCTAAGAAATTTGGTCAA AA Reverse : GGGGGG CTGCAG CTACTGATTATTGTAATCAGC

^aRestriction sites are in bold, RBS sequences are italicized

Table 3. Specific production and antimicrobial activity

Strain	Specific production ^{a,b}	MIC ^{a,c}
<i>L. lactis</i> NZ9000_pSec:: <i>rpdaA</i>	2,3 ± 0.4	1.5 ± 0.3
<i>L. lactis</i> NZ9000_pSec:: <i>s-rpdaA</i>	3,5 ± 0.2*	1.2 ± 0.1
<i>L. lactis</i> NZ9000_pSec:: <i>l-rpdaA</i>	3,2 ± 0,3*	1.2 ± 0.2
<i>L. lactis</i> NZ9000_pSec:: <i>s-rpdaA</i> _pOri23	4,0 ± 0,7	1.3 ± 0.5
<i>L. lactis</i> NZ9000_pSec:: <i>s-rpdaA</i> _pOri:: <i>pedC</i>	1,4 ± 0.1**	0.4 ± 0.1

^aMean ± standard deviation

^bSpecific production was expressed as μmol equivalents of pediocin PA-1/g of dry weight bacteria

^cMIC values of culture supernatants were expressed in μM pediocin PA-1 equivalents

*Indicate a significant difference (Student's *t*-test, *p*-value < 0,05) of specific production between the strains *L. lactis* NZ9000_pSec::*s-rpdaA* *L. lactis* NZ9000_pSec::*l-rpdaA* and the control strain *L. lactis* NZ9000_pSec::*rpdaA*

**Indicate a significant difference (Student's *t*-test, *p*-value < 0,05) of specific production between the strains *L. lactis* NZ9000_pSec::*s-rpdaA*_pOri::*pedC* and the control strain *L. lactis* NZ9000_pSec::*s-rpdaA*_pOri::*pedC*.

Figure legends:

Figure 1: Construction of pSec derivatives. The restriction sites used for cloning purpose are indicated. The plasmid pSec and derivatives contain the nisin inducible promoter P_{nisA} , the replication genes *repA* and *repC*, the gene conferring resistance to chloramphenicol, and a transcriptional terminator term.

Figure 2: Antibacterial activity of recombinant pediocins. The antibacterial activity of recombinant pediocins was assessed on agar plate using the sensitive strain *C. maltaromaticum* DSM20730_pSec::*nucB*_pOri23 (line A and C) or the pediocin PA-1 resistant strain *C. maltaromaticum* DSM20730_pSec::*nucB*_pOri::*pedB* as target strains (line B and D). Pictures in line A panel 1, 2, 3, 4 and B panel 1, 2, 3, 4 show the inhibitory activity of the culture supernatants containing NucB, Rpediocin, S-Rpediocin, and L-Rpediocin, respectively. NucB is produced by *L. lactis* NZ9000_pSec::*nucB* and was used as a negative control. *L. lactis* NZ9000_pSec::*s-rped* was transformed with either pOri23 (line C panel 1 and line D panel 1) or pOri::*pedC* (line C panel 2 and line D panel 2). The culture supernatants were assayed for antibacterial activity by using the strain *C. maltaromaticum*_pSec_pOri23 as indicator strain.

Figure 3: Genetic structure of gene clusters of class IIa bacteriocin containing a *pedC* homologue.

317 **Figure**
318
319 Fig.1

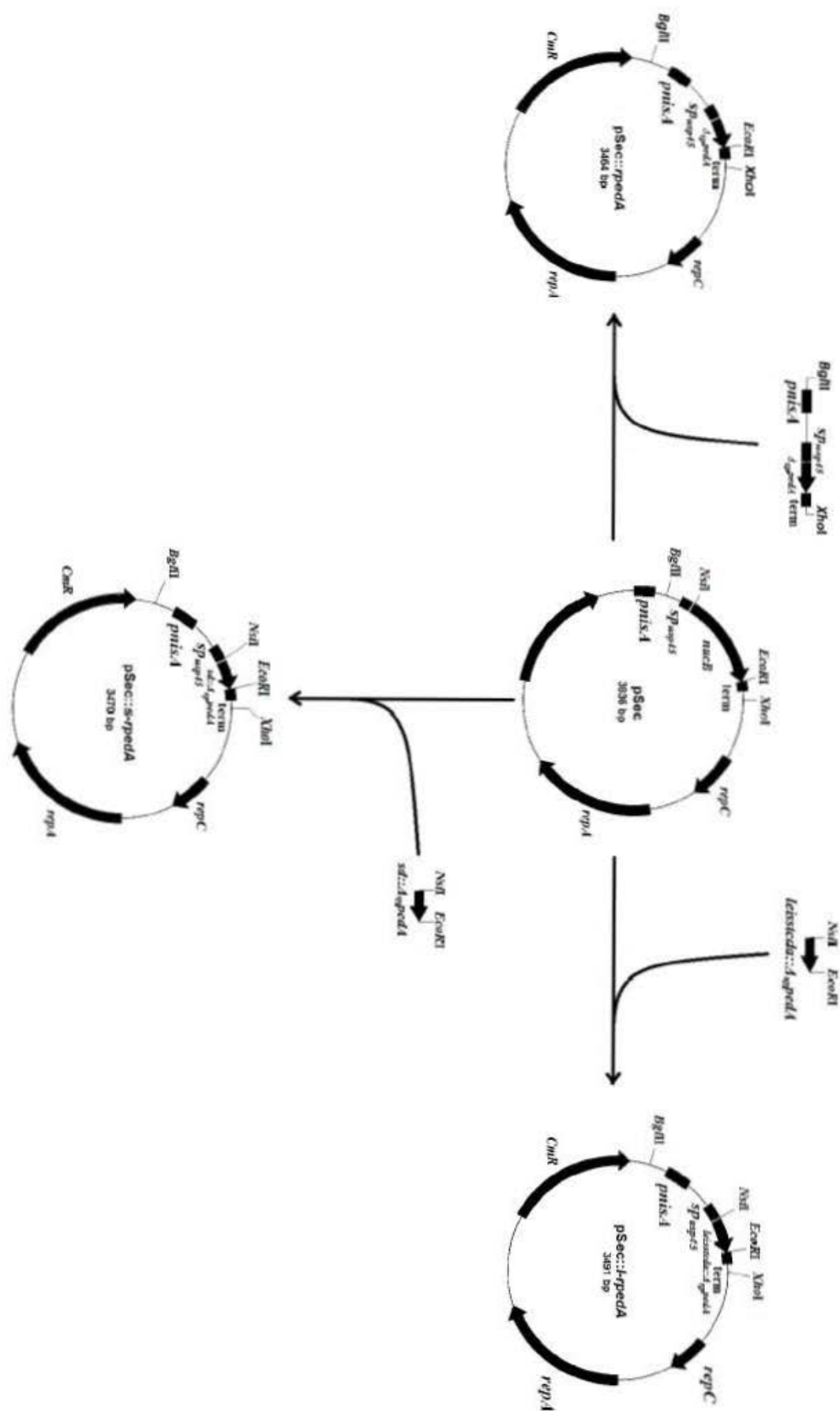


Fig.2

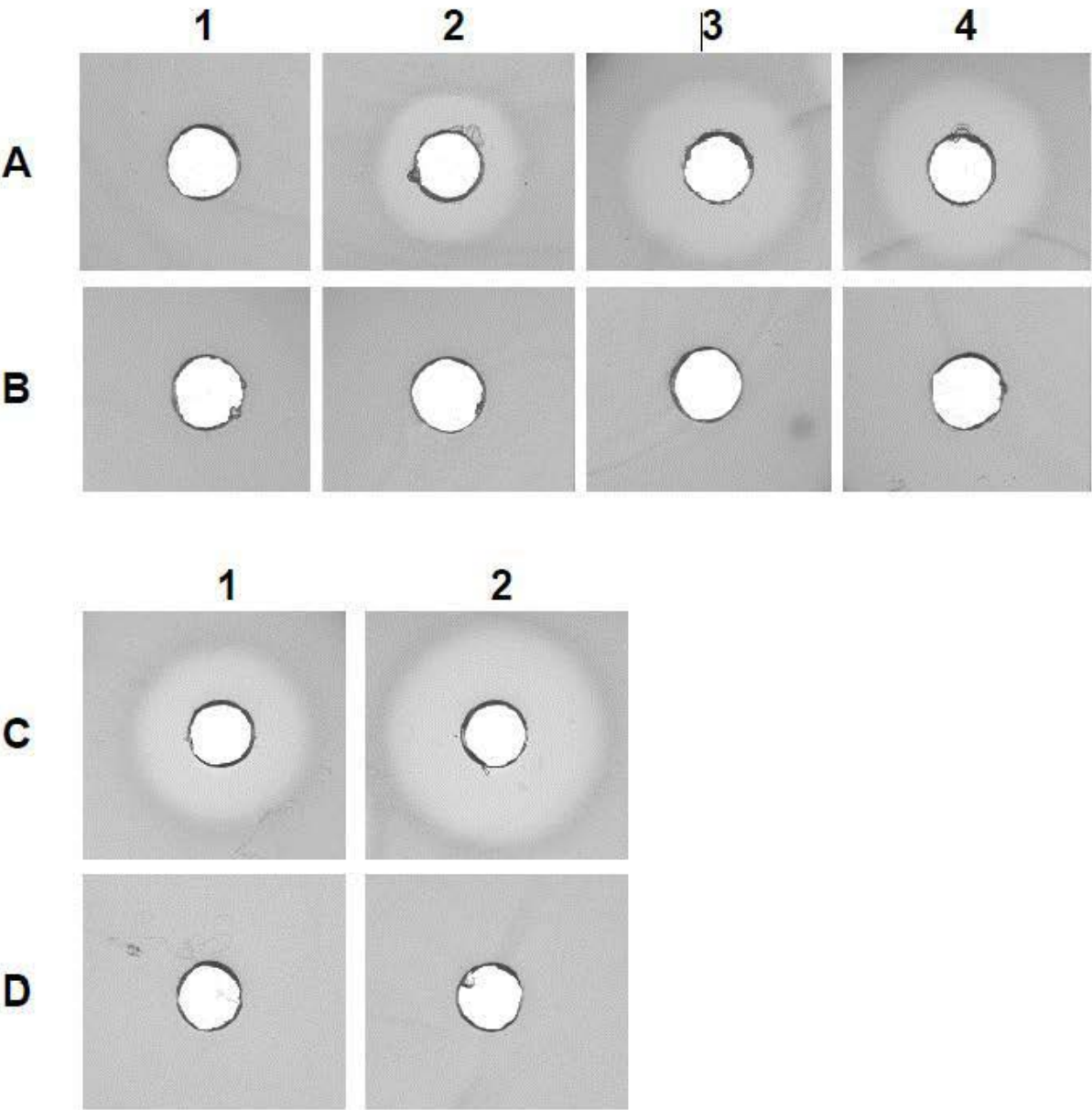
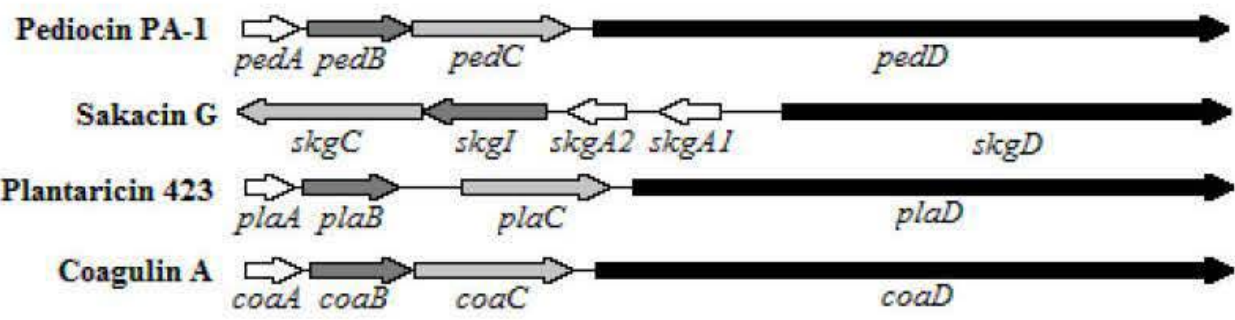


Fig.3



Bibliographie

- ABEE, T, L KROCKEL et C HILL (1995). « Bacteriocins : modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning ». *International journal of food microbiology* 28.2, pages 169–185.
- ACUÑA, Leonardo, Gianluca PICARIELLO, Fernando SESMA, Roberto D. MORERO et Augusto BELLOMIO (2012). « A new hybrid bacteriocin, Ent35-MccV, displays antimicrobial activity against pathogenic Gram-positive and Gram-negative bacteria ». *FEBS Open Bio* 2, pages 12–19.
- AFZAL, Muhammad Inam *et al.* (2010). « *Carnobacterium maltaromaticum* : Identification, isolation tools, ecology and technological aspects in dairy products ». *Food Microbiology* 27.5, pages 573–579.
- ALLISON, G E, R W WOROBO, M E STILES et T R KLAENHAMMER (1995). « Heterologous expression of the lactacin F peptides by *Carnobacterium piscicola* LV17 ». *Applied and environmental microbiology* 61.4, pages 1371–1377.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* (1997). « Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs ». *Nucleic Acids Research* 25.17, pages 3389–3402.
- ANFINSEN, C B (1973). « Principles that govern the folding of protein chains ». *Science* 181.4096, pages 223–230.
- ARQUÉS, J L, J M RODRÍGUEZ, M J GASSON et N HORN (2008). « Immunity gene pedB enhances production of pediocin PA-1 in naturally resistant *Lactococcus lactis* strains ». *Journal of dairy science* 91.7, pages 2591–2594.
- ASSELDONK, M van, W M de VOS et G SIMONS (1993). « Functional analysis of the *Lactococcus lactis* usp45 secretion signal in the secretion of a homologous proteinase and a heterologous alpha-amylase ». *Molecular & general genetics : MGG* 240.3, pages 428–434.
- AVALL-JÄÄSKELÄINEN, Silja, Kari KYLÄ-NIKKILÄ, Minna KAHALA, Terhi MIIKKULAINEN-LAHTI et Airi PALVA (2002). « Surface display of foreign epitopes on the *Lactobacillus brevis* S-layer ». *Applied and Environmental Microbiology* 68.12, pages 5943–5951.
- AXELSSON, Lars, Tone KATLA, Merete BJØRNSLETT, Vincent G.H EIJSINK et Askild HOLCK (1998). « A system for heterologous expression of bacteriocins in *Lactobacillus sake* ». *FEMS Microbiology Letters* 168.1, pages 137–143.
- BADER, M., W. MUSE, T. ZANDER et J. BARDWELL (1998). « Reconstitution of a protein disulfide catalytic system ». *The Journal of Biological Chemistry* 273.17, pages 10302–10307.

- BAKKAL, Suphan, Sandra M. et Margaret A. (2012). « Bacteriocins of Aquatic Microorganisms and Their Potential Applications in the Seafood Industry ». *Health and Environment in Aquaculture*. Sous la direction d'Edmir CARVALHO. InTech.
- BEAULIEU, Lucie, Denis GROLEAU, Carlos B MIGUEZ, Jean-François JETTÉ, Hafida AOMARI et Muriel SUBIRADE (2005). « Production of pediocin PA-1 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* reveals unexpected inhibition of its biological activity due to the presence of collagen-like material ». *Protein expression and purification* 43.2, pages 111–125.
- BEAULIEU, Lucie, Dmitri TOLKATCHEV, Jean-François JETTÉ, Denis GROLEAU et Muriel SUBIRADE (2007). « Production of active pediocin PA-1 in *Escherichia coli* using a thioredoxin gene fusion expression approach : cloning, expression, purification, and characterization ». *Canadian journal of microbiology* 53.11, pages 1246–1258.
- BENNIK, Marjon H. J., Berlinda VANLOO, Robert BRASSEUR, Leon G. M. GORRIS et Eddy J. SMID (1998). « A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated *Enterococcus mundtii* : full characterization and interaction with target organisms ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1373.1, pages 47–58.
- BERMÚDEZ-HUMARÁN, L. G. *et al.* (2002). « Production of Human Papillomavirus Type 16 E7 Protein in *Lactococcus lactis* ». *Applied and Environmental Microbiology* 68.2, pages 917–922.
- BERMÚDEZ-HUMARÁN, Luis G *et al.* (2007). « Antimicrobial activity of divercin RV41 produced and secreted by *Lactococcus lactis* ». *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 13.4, pages 259–263.
- BHUGALOO-VIAL, Parwin, Jean-Paul DOULIEZ, Daniel MOLLE, Xavier DOUSSET, Patrick BOYAVAL et Didier MARION (1999). « Delineation of Key Amino Acid Side Chains and Peptide Domains for Antimicrobial Properties of Divercin V41, a Pediocin-Like Bacteriocin Secreted by *Carnobacterium divergens* V41 ». *Applied and Environmental Microbiology* 65.7, pages 2895–2900.
- BIET, F, J M BERJEAUD, R W WOROBO, Y CENATIEMPO et C FREMAUX (1998). « Heterologous expression of the bacteriocin mesentericin Y105 using the dedicated transport system and the general secretion pathway ». *Microbiology (Reading, England)* 144 (Pt 10), pages 2845–2854.
- BODAPATI, Krishna Chaitanya, Rania SOUDY, Hashem ETAYASH, Michael STILES et Kamaljit KAUR (2013). « Design, synthesis and evaluation of antimicrobial activity of N-terminal modified Leucocin A analogues ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 21.13, pages 3715–3722.
- BOQUIEN, Clair-Yves, Georges CORRIEU et Michel J. DESMAZEAUD (1988). « Effect of Fermentation Conditions on Growth of *Streptococcus cremoris* AM2 and *Leuconostoc lactis* CNRZ 1091 in Pure and Mixed Cultures ». *Applied and Environmental Microbiology* 54.10, pages 2527–2531.
- BORRERO, Juan, Juan J. JIMÉNEZ, Loreto GÚTIEZ, Carmen HERRANZ, Luis M. CINTAS et Pablo E. HERNANDEZ (2011a). « Protein expression vector and secretion signal peptide optimization to drive the production, secretion, and functional expression of the bacteriocin enterocin A in lactic acid bacteria ». *Journal of Biotechnology* 156.1, pages 76–86.

- BORRERO, Juan, Juan J JIMÉNEZ, Loreto GÚTIEZ, Carmen HERRANZ, Luis M CINTAS et Pablo E HERNÁNDEZ (2011b). « Use of the usp45 lactococcal secretion signal sequence to drive the secretion and functional expression of enterococcal bacteriocins in *Lactococcus lactis* ». *Applied microbiology and biotechnology* 89.1, pages 131–143.
- BORRERO, Juan *et al.* (2012). « Cloning, Production, and Functional Expression of the Bacteriocin Enterocin A, Produced by *Enterococcus faecium* T136, by the Yeasts *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, and *Arxula adeninivorans* ». *Applied and Environmental Microbiology* 78.16, pages 5956–5961.
- BROGDEN, Kim A (2005). « Antimicrobial peptides : pore formers or metabolic inhibitors in bacteria ? » *Nature reviews. Microbiology* 3.3, pages 238–250.
- BUKHTIYAROVA, M, R YANG et B RAY (1994). « Analysis of the pediocin AcH gene cluster from plasmid pSMB74 and its expression in a pediocin-negative *Pediococcus acidilactici* strain ». *Applied and environmental microbiology* 60.9, pages 3405–3408.
- BURIANEK, L.I. et A.e. YOUSEF (2000). « Solvent extraction of bacteriocins from liquid cultures ». *Letters in Applied Microbiology* 31.3, pages 193–197.
- BUYONG, Nurliza, Jan KOK et John B. LUCHANSKY (1998). « Use of a Genetically Enhanced, Pediocin-Producing Starter Culture, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM217, To Control *Listeria monocytogenes* in Cheddar Cheese ». *Applied and Environmental Microbiology* 64.12, pages 4842–4845.
- CAI, H., C. C. WANG et C. L. TSOU (1994). « Chaperone-like activity of protein disulfide isomerase in the refolding of a protein with no disulfide bonds ». *The Journal of Biological Chemistry* 269.40, pages 24550–24552.
- CAILLIEZ-GRIMAL, C., H. C. EDIMA, A.-M. REVOL-JUNELLES et J.-B. MILLIÈRE (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* 90.3, pages 1133–1138.
- CASAUS, P., T. NILSEN, L. M. CINTAS, I. F. NES, P. E. HERNÁNDEZ et H. HOLO (1997). « Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A ». *Microbiology (Reading, England)* 143 (Pt 7), pages 2287–2294.
- CASTANO, Sabine, Bernard DESBAT, Antoine DELFOUR, Jean Marie DUMAS, Alexandra da SILVA et Jean DUFOURCQ (2005). « Study of structure and orientation of mesentericin Y105, a bacteriocin from Gram-positive *Leuconostoc mesenteroides*, and its Trp-substituted analogues in phospholipid environments ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1668.1, pages 87–98.
- CHEN, J., J. L. SONG, S. ZHANG, Y. WANG, D. F. CUI et C. C. WANG (1999). « Chaperone activity of DsbC ». *The Journal of Biological Chemistry* 274.28, pages 19601–19605.
- CHEN, Ping, Jan NOVAK, Marion KIRK, Stephen BARNES, FengXia Qi et Page W. CAUFIELD (1998). « Structure-Activity Study of the Lantibiotic Mutacin II from *Streptococcus mutans* T8 by a Gene Replacement Strategy ». *Applied and Environmental Microbiology* 64.7, pages 2335–2340.
- CHEN, Y., R. D. LUDESCHER et T. J. MONTVILLE (1997a). « Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its

- fragments to phospholipid vesicles. » *Applied and Environmental Microbiology* 63.12, pages 4770–4777.
- CHEN, Y., R SHAPIRA, M EISENSTEIN et T J MONTVILLE (1997b). « Functional characterization of pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a predicted tertiary structure. » *Applied and Environmental Microbiology* 63.2, pages 524–531.
- CHIKINDAS, M L *et al.* (1993). « Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells ». *Applied and environmental microbiology* 59.11, pages 3577–3584.
- CHIKINDAS, M L, K VENEMA, A M LEDEBOER, G VENEMA et J KOK (1995). « Expression of lactococcin A and pediocin PA-1 in heterologous hosts ». *Letters in applied microbiology* 21.3, pages 183–189.
- CHONG, Barrie Fong et Lars K. NIELSEN (2003). « Amplifying the cellular reduction potential of *Streptococcus zooepidemicus* ». *Journal of Biotechnology* 100.1, pages 33–41.
- CHRISTENSEN, D P et R W HUTKINS (1992). « Collapse of the proton motive force in *Listeria monocytogenes* caused by a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. » *Applied and Environmental Microbiology* 58.10, pages 3312–3315.
- CINTAS, L M, P CASAUS, L S HAVARSTEIN, P E HERNANDEZ et I F NES (1997). « Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. » *Applied and Environmental Microbiology* 63.11, pages 4321–4330.
- CLEVELAND, J, T J MONTVILLE, I F NES et M L CHIKINDAS (2001). « Bacteriocins : safe, natural antimicrobials for food preservation ». *International journal of food microbiology* 71.1, pages 1–20.
- « Cloning of pediocin PA-1 and its immunity genes from ».
- COLLET, Jean-Francois et James C. A. BARDWELL (2002). « Oxidative protein folding in bacteria ». *Molecular Microbiology* 44.1, pages 1–8.
- COTTER, P. D., C. HILL et R. P. ROSS (2005a). « Bacteriocins : Developing innate immunity for food ». *Nature Reviews Microbiology* 3.10, pages 777–788.
- COTTER, Paul D. *et al.* (2005b). « Posttranslational conversion of l-serines to d-alanines is vital for optimal production and activity of the lantibiotic lactacin 3147 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102.51, pages 18584–18589.
- COTTER, Paul D, R Paul ROSS et Colin HILL (2013). « Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics ? » *Nature reviews. Microbiology* 11.2, pages 95–105.
- COVENTRY, M J, J B GORDON, M ALEXANDER, M W HICKEY et J WAN (1996). « A food-grade process for isolation and partial purification of bacteriocins of lactic acid bacteria that uses diatomite calcium silicate. » *Applied and Environmental Microbiology* 62.5, pages 1764–1769.
- CUI, Yanhua *et al.* (2012). « Class IIa Bacteriocins : Diversity and New Developments ». *International journal of molecular sciences* 13.12, pages 16668–16707.
- CUOZZO, S, S CALVEZ, H PRÉVOST et D DRIDER (2006). « Improvement of enterocin P purification process ». *Folia microbiologica* 51.5, pages 401–405.

- DALET, K., Y. CENATIEMPO, P. COSSART, Y. HÉCHARD et EUROPEAN LISTERIA GENOME CONSORTIUM (2001). « A sigma(54)-dependent PTS permease of the mannose family is responsible for sensitivity of *Listeria monocytogenes* to mesentericin Y105 ». *Microbiology (Reading, England)* 147 (Pt 12), pages 3263–3269.
- DANIELS, Robert *et al.* (2010). « Disulfide bond formation and cysteine exclusion in gram-positive bacteria ». *The Journal of Biological Chemistry* 285.5, pages 3300–3309.
- DARMON, Elise *et al.* (2002). « A novel class of heat and secretion stress-responsive genes is controlled by the autoregulated CsxRS two-component system of *Bacillus subtilis* ». *Journal of Bacteriology* 184.20, pages 5661–5671.
- DAVEY, Lauren, Crystal K W NG, Scott A HALPERIN et Song F LEE (2013). « Functional analysis of paralogous thiol-disulfide oxidoreductases in *Streptococcus gordonii* ». *The Journal of biological chemistry* 288.23, pages 16416–16429.
- DELOM, F., B. MALLET, P. CARAYON et P. J. LEJEUNE (2001). « Role of extracellular molecular chaperones in the folding of oxidized proteins. Refolding of colloidal thyroglobulin by protein disulfide isomerase and immunoglobulin heavy chain-binding protein ». *The Journal of Biological Chemistry* 276.24, pages 21337–21342.
- DIEP, D. B., L. AXELSSON, C. GREFSLI et I. F. NES (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, England)* 146 (Pt 9), pages 2155–2160.
- DIEP, Dzung B., Morten SKAUGEN, Zhian SALEHIAN, Helge HOLO et Ingolf F. NES (2007). « Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104.7, pages 2384–2389.
- DIEYE, Y., S. USAI, F. CLIER, A. GRUSS et J. C. PIARD (2001). « Design of a protein-targeting system for lactic acid bacteria ». *Journal of Bacteriology* 183.14, pages 4157–4166.
- DOBSON, Alleson, Paul D COTTER, R Paul ROSS et Colin HILL (2012). « Bacteriocin production : a probiotic trait ? » *Applied and environmental microbiology* 78.1, pages 1–6.
- DORENBOS, Ronald (2004). « Thiol-disulfide Oxidoreductases in *Bacillus subtilis* ». Thèse de doctorat. Groningen, the Netherlands : University of Groningen. 255 pages.
- DORENBOS, Ronald *et al.* (2002). « Thiol-disulfide oxidoreductases are essential for the production of the lantibiotic sublancin 168 ». *The Journal of biological chemistry* 277.19, pages 16682–16688.
- DRIDER, Djamel, Gunnar FIMLAND, Yann HECHARD, Lynn M. McMULLEN et Herve PREVOST (2006). « The Continuing Story of Class IIa Bacteriocins ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70.2, pages 564–582.
- DUMOULIN, Alexis, Ulla GRAUSCHOPF, Markus BISCHOFF, Linda THÖNY-MEYER et Brigitte BERGER-BÄCHI (2005). « *Staphylococcus aureus* DsbA is a membrane-bound lipoprotein with thiol-disulfide oxidoreductase activity ». *Archives of Microbiology* 184.2, pages 117–128.
- DUTTON, Rachel J., Dana BOYD, Mehmet BERKMEN et Jon BECKWITH (2008). « Bacterial species exhibit diversity in their mechanisms and capacity for protein disulfide

- bond formation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105.33, pages 11933–11938.
- EICHENBAUM, Zehava *et al.* (1998). « Use of the Lactococcal nisA Promoter To Regulate Gene Expression in Gram-Positive Bacteria : Comparison of Induction Level and Promoter Strength ». *Applied and Environmental Microbiology* 64.8, pages 2763–2769.
- EIJSINK, V. G., M. SKEIE, P. H. MIDDELHOVEN, M. B. BRURBERG et I. F. NES (1998). « Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria ». *Applied and Environmental Microbiology* 64.9, pages 3275–3281.
- EIJSINK, Vincent G H, Lars AXELSSON, Dzong B DIEP, Leiv S HÅVARSTEIN, Helge HOLO et Ingolf F NES (2002). « Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria ; an example of biological warfare and communication ». *Antonie van Leeuwenhoek* 81.1, pages 639–654.
- ENNAHAR, S, K SONOMOTO et A ISHIZAKI (1999). « Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria : antibacterial activity and food preservation ». *Journal of bioscience and bioengineering* 87.6, pages 705–716.
- ENNAHAR, Saïd, Toshihiro SASHIHARA, Kenji SONOMOTO et Ayaaki ISHIZAKI (2000). « Class IIa bacteriocins : biosynthesis, structure and activity ». *FEMS Microbiology Reviews* 24.1, pages 85–106.
- EOM, Ji-Eun, Sung-Kwon MOON et Gi-Seong MOON (2010). « Heterologous production of pediocin PA-1 in *Lactobacillus reuteri* ». *Journal of microbiology and biotechnology* 20.8, pages 1215–1218.
- FABIANEK, Renata A, Hauke HENNECKE et Linda THÖNY-MEYER (2000). « Periplasmic protein thiol :disulfide oxidoreductases of *Escherichia coli* ». *FEMS Microbiology Reviews* 24.3, pages 303–316.
- FERNÁNDEZ, Luis A. et Víctor DE LORENZO (2001). « Formation of disulphide bonds during secretion of proteins through the periplasmic-independent type I pathway ». *Molecular Microbiology* 40.2, pages 332–346.
- FIMLAND, G, O R BLINGSMO, K SLETTEN, G JUNG, I F NES et J NISSEN-MEYER (1996). « New biologically active hybrid bacteriocins constructed by combining regions from various pediocin-like bacteriocins : the C-terminal region is important for determining specificity. » *Applied and Environmental Microbiology* 62.9, pages 3313–3318.
- FIMLAND, G, R JACK, G JUNG, I F NES et J NISSEN-MEYER (1998). « The bactericidal activity of pediocin PA-1 is specifically inhibited by a 15-mer fragment that spans the bacteriocin from the center toward the C terminus ». *Applied and environmental microbiology* 64.12, pages 5057–5060.
- FIMLAND, G *et al.* (2000). « A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum ». *Journal of bacteriology* 182.9, pages 2643–2648.
- FIMLAND, G, Vincent G. H. EIJSINK et Jon NISSEN-MEYER (2002a). « Comparative studies of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins ». *Microbiology (Reading, England)* 148 (Pt 11), pages 3661–3670.
- FIMLAND, G, Vincent G. H. EIJSINK et Jon NISSEN-MEYER (2002b). « Mutational analysis of the role of tryptophan residues in an antimicrobial peptide ». *Biochemistry* 41.30, pages 9508–9515.

- FIMLAND, G, Line JOHNSEN, Bjørn DALHUS et Jon NISSEN-MEYER (2005). « Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins : biosynthesis, structure, and mode of action ». *Journal of Peptide Science* 11.11, pages 688–696.
- FIMLAND, G *et al.* (2006). « Mutational analysis and membrane-interactions of the beta-sheet-like N-terminal domain of the pediocin-like antimicrobial peptide sakacin P ». *Biochimica et biophysica acta* 1764.6, pages 1132–1140.
- FLEURY, Y. *et al.* (1996). « Covalent structure, synthesis, and structure-function studies of mesentericin Y 105(37), a defensive peptide from gram-positive bacteria *Leuconostoc mesenteroides* ». *The Journal of Biological Chemistry* 271.24, pages 14421–14429.
- FOMENKO, Dmitri E. et Vadim N. GLADYSHEV (2002). « CxxS : fold-independent redox motif revealed by genome-wide searches for thiol/disulfide oxidoreductase function ». *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 11.10, pages 2285–2296.
- FONTAINE, Laetitia et Pascal HOLS (2008). « The inhibitory spectrum of thermophilin 9 from *Streptococcus thermophilus* LMD-9 depends on the production of multiple peptides and the activity of BlpG(St), a thiol-disulfide oxidase ». *Applied and environmental microbiology* 74.4, pages 1102–1110.
- FREGEAU GALLAGHER, N. L., M. SAILER, W. P. NIEMCZURA, T. T. NAKASHIMA, M. E. STILES et J. C. VEDERAS (1997). « Three-dimensional structure of leucocin A in trifluoroethanol and dodecylphosphocholine micelles : spatial location of residues critical for biological activity in type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria ». *Biochemistry* 36.49, pages 15062–15072.
- FREITAS, D. A. *et al.* (2005). « Secretion of *Streptomyces tendae* antifungal protein 1 by *Lactococcus lactis* ». *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38.11, pages 1585–1592.
- FRENCH, G L (2010). « The continuing crisis in antibiotic resistance ». *International journal of antimicrobial agents* 36 Suppl 3, S3–7.
- GABRIELSEN, Christina, Dag A. BREDE, Ingolf F. NES et Dzung B. DIEP (2014). « Circular bacteriocins : biosynthesis and mode of action. » *Applied and Environmental Microbiology*, AEM.02284–14.
- GALVIN, M., C. HILL et R. P. ROSS (1999). « Lacticin 3147 displays activity in buffer against Gram-positive bacterial pathogens which appear insensitive in standard plate assays ». *Letters in Applied Microbiology* 28.5, pages 355–358.
- GARNEAU, Sylvie, Claire A. FERENEC, Marco J. van BELKUM, Michael E. STILES et John C. VEDERAS (2003). « Purification and Characterization of Brochocin A and Brochocin B(10-43), a Functional Fragment Generated by Heterologous Expression in *Carnobacterium piscicola* ». *Applied and Environmental Microbiology* 69.3, pages 1352–1358.
- GIBBS, Gerard M., Barrie E. DAVIDSON et Alan J. HILLIER (2004). « Novel Expression System for Large-Scale Production and Purification of Recombinant Class IIa Bacteriocins and Its Application to Piscicolin 126 ». *Applied and Environmental Microbiology* 70.6, pages 3292–3297.
- GONZALEZ, B, P ARCA, B MAYO et J E SUAREZ (1994). « Detection, purification, and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus*

- plantarum* strain of dairy origin. » *Applied and Environmental Microbiology* 60.6, pages 2158–2163.
- GONZALEZ, Carlos F. et Blair S. KUNKA (1987). « Plasmid-Associated Bacteriocin Production and Sucrose Fermentation in *Pediococcus acidilactici* ». *Applied and Environmental Microbiology* 53.10, pages 2534–2538.
- GRATIA, André (1925). « Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille ». *Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales* 93, pages 1040–1041.
- GRAUSCHOPF, Ulla, Andrea FRITZ et Rudi GLOCKSHUBER (2003). « Mechanism of the electron transfer catalyst DsbB from *Escherichia coli* ». *The EMBO journal* 22.14, pages 3503–3513.
- GUCHTE, M. van de, J. KOK et G. VENEMA (1991). « Distance-dependent translational coupling and interference in *Lactococcus lactis* ». *Molecular & general genetics : MGG* 227.1, pages 65–71.
- GUILHOT, C., G. JANDER, N. L. MARTIN et J. BECKWITH (1995). « Evidence that the pathway of disulfide bond formation in *Escherichia coli* involves interactions between the cysteines of DsbB and DsbA ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92.21, pages 9895–9899.
- GURSKY, Lucas J. *et al.* (2006). « Production of piscicolin 126 by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL26 is controlled by temperature and induction peptide concentration ». *Archives of Microbiology* 186.4, pages 317–325.
- GUTIÉRREZ, Jorge *et al.* (2004). « Performance and applications of polyclonal antipeptide antibodies specific for the enterococcal bacteriocin enterocin P ». *Journal of agricultural and food chemistry* 52.8, pages 2247–2255.
- GUTIÉRREZ, Jorge *et al.* (2005a). « Heterologous extracellular production of enterocin P from *Enterococcus faecium* P13 in the methylotrophic bacterium *Methylobacterium extorquens* ». *FEMS microbiology letters* 248.1, pages 125–131.
- GUTIÉRREZ, Jorge, Raquel CRIADO, María MARTÍN, Carmen HERRANZ, Luis M. CINTAS et Pablo E. HERNANDEZ (2005b). « Production of Enterocin P, an Antilisterial Pediocin-Like Bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13, in *Pichia pastoris* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49.7, pages 3004–3008.
- GUYONNET, D., C. FREMAUX, Y. CENATIEMPO et J. M. BERJEAUD (2000). « Method for Rapid Purification of Class IIa Bacteriocins and Comparison of Their Activities ». *Applied and Environmental Microbiology* 66.4, pages 1744–1748.
- HALAMI, Prakash M. et Arun CHANDRASHEKAR (2007). « Heterologous expression, purification and refolding of an anti-listerial peptide produced by *Pediococcus acidilactici* K7 ». *Electronic Journal of Biotechnology* 10.4, pages 563–569.
- HAMILTON-MILLER, J M (1973). « Chemistry and biology of the polyene macrolide antibiotics. » *Bacteriological Reviews* 37.2, pages 166–196.
- HASTINGS, J. W., M. SAILER, K. JOHNSON, K. L. ROY, J. C. VEDERAS et M. E. STILES (1991). « Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum* ». *Journal of Bacteriology* 173.23, pages 7491–7500.
- HAUGEN, Helen Sophie, Gunnar FIMLAND, Jon NISSEN-MEYER et Per Eugen KRISTIANSEN (2005). « Three-dimensional structure in lipid micelles of the pediocin-like antimicrobial peptide curvacin A ». *Biochemistry* 44.49, pages 16149–16157.

- HAUGEN, Helén Sophie, Per Eugen KRISTIANSEN, Gunnar FIMLAND et Jon NISSEN-MEYER (2008). « Mutational analysis of the class IIa bacteriocin curvacin A and its orientation in target cell membranes ». *Applied and environmental microbiology* 74.21, pages 6766–6773.
- HAUGEN, Helén Sophie, Gunnar FIMLAND et Jon NISSEN-MEYER (2011). « Mutational analysis of residues in the helical region of the class IIa bacteriocin pediocin PA-1 ». *Applied and environmental microbiology* 77.6, pages 1966–1972.
- HÉCHARD, Y., C. PELLETIER, Y. CENATIEMPO et J. FRÈRE (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 (Reading, England)* 147 (Pt 6), pages 1575–1580.
- HEEL, Auke Johan van, Manuel MONTALBAN-LOPEZ et Oscar P KUIPERS (2011). « Evaluating the feasibility of lantibiotics as an alternative therapy against bacterial infections in humans ». *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 7.6, pages 675–680.
- HENDERSON, James T., Amy L. CHOPKO et P. Dick van WASSENAAR (1992). « Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0 ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 295.1, pages 5–12.
- HERAS, Begoña *et al.* (2008). « Staphylococcus aureus DsbA Does Not Have a Destabilizing Disulfide A NEW PARADIGM FOR BACTERIAL OXIDATIVE FOLDING ». *Journal of Biological Chemistry* 283.7, pages 4261–4271.
- HERRANZ, C., L. M. CINTAS, P. E. HERNÁNDEZ, G. N. MOLL et A. J. DRIESSEN (2001). « Enterocin P causes potassium ion efflux from *Enterococcus faecium* T136 cells ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45.3, pages 901–904.
- HERRANZ, Carmen et Arnold J. M. DRIESSEN (2005). « Sec-Mediated Secretion of Bacteriocin Enterocin P by *Lactococcus lactis* ». *Applied and Environmental Microbiology* 71.4, pages 1959–1963.
- HOLCK, Askild, Lars AXELSSON, Stein-Erik BIRKELAND, Thea AUKRUST et Hans BLOM (1992). « Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706 ». *Journal of General Microbiology* 138.12, pages 2715–2720.
- HOLCK, Askild, Lars AXELSSON et Ulrich SCHILLINGER (1996). « Divergicin 750, a novel bacteriocin produced by *Carnobacterium divergens* 750 ». *FEMS Microbiology Letters* 136.2, pages 163–168.
- HOLMGREN, A. (1989). « Thioredoxin and glutaredoxin systems ». *The Journal of Biological Chemistry* 264.24, pages 13963–13966.
- HOLO, H et I F NES (1989). « High-Frequency Transformation, by Electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. cremoris Grown with Glycine in Osmotically Stabilized Media ». *Applied and environmental microbiology* 55.12, pages 3119–3123.
- HOLZAPFEL, W. H., R. GEISEN et U. SCHILLINGER (1995). « Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes ». *International Journal of Food Microbiology* 24.3, pages 343–362.
- HORN, Nikki *et al.* (1998). « Production of Pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis* Using the Lactococcin A Secretory Apparatus ». *Applied and Environmental Microbiology* 64.3, pages 818–823.

- HORN, Nikki *et al.* (1999). « Enhanced Production of Pediocin PA-1 and Coproduction of Nisin and Pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis* ». *Applied and Environmental Microbiology* 65.10, pages 4443–4450.
- HORN, Nikki, Antonio FERNÁNDEZ, Helen M DODD, Michael J GASSON et Juan M RODRÍGUEZ (2004). « Nisin-controlled production of pediocin PA-1 and colicin V in nisin- and non-nisin-producing *Lactococcus lactis* strains ». *Applied and environmental microbiology* 70.8, pages 5030–5032.
- HOSHINO, Kyoko, Akiko EDA, Yoichi KUROKAWA et Norio SHIMIZU (2002). « Production of brain-derived neurotrophic factor in *Escherichia coli* by coexpression of Dsb proteins ». *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 66.2, pages 344–350.
- INGHAM, A B, K W SPROAT, M L V TIZARD et R J MOORE (2005). « A versatile system for the expression of nonmodified bacteriocins in *Escherichia coli* ». *Journal of applied microbiology* 98.3, pages 676–683.
- JACK, R W, J R TAGG et B RAY (1995). « Bacteriocins of gram-positive bacteria. » *Microbiological Reviews* 59.2, pages 171–200.
- JACK, R W *et al.* (1996). « Characterization of the chemical and antimicrobial properties of piscicolin 126, a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* JG126. » *Applied and Environmental Microbiology* 62.8, pages 2897–2903.
- JACQUET, Thibaut *et al.* (2012). « Antibacterial activity of class IIa bacteriocin Cbn BM1 depends on the physiological state of the target bacteria ». *Research in microbiology* 163.5, pages 323–331.
- JANDER, G., N. L. MARTIN et J. BECKWITH (1994). « Two cysteines in each periplasmic domain of the membrane protein DsbB are required for its function in protein disulfide bond formation ». *The EMBO journal* 13.21, pages 5121–5127.
- JANES, M. E., R. NANNAPANENI, A. PROCTOR et M. G. JOHNSON (1998). « Rice Hull Ash and Silicic Acid as Adsorbents for Concentration of Bacteriocins ». *Applied and Environmental Microbiology* 64.11, pages 4403–4409.
- JASNIEWSKI, Jordane, Catherine CAILLIEZ-GRIMAL, Mohamed YOUNSI, Jean-Bernard MILLIÈRE et Anne-Marie REVOL-JUNELLES (2008a). « Fluorescence anisotropy analysis of the mechanism of action of mesenterocin 52A : speculations on antimicrobial mechanism ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 81.2, pages 339–347.
- JASNIEWSKI, Jordane, Catherine CAILLIEZ-GRIMAL, Mohamed YOUNSI, Jean-Bernard MILLIÈRE et Anne-Marie REVOL-JUNELLES (2008b). « Functional differences in *Leuconostoc* sensitive and resistant strains to mesenterocin 52A, a class IIa bacteriocin ». *FEMS Microbiology Letters* 289.2, pages 193–201.
- JASNIEWSKI, Jordane, Catherine CAILLIEZ-GRIMAL, Eric GELHAYE et Anne-Marie REVOL-JUNELLES (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* ». *Journal of microbiological methods* 73.1, pages 41–48.
- JIMÉNEZ, Juan J *et al.* (2013). « Cloning, production, and functional expression of the bacteriocin sakacin A (SakA) and two SakA-derived chimeras in lactic acid bacteria (LAB) and the yeasts *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis* ». *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 40.9, pages 977–993.

- JOHNSEN, L, G FIMLAND, V EIJSINK et J NISSEN-MEYER (2000). « Engineering increased stability in the antimicrobial peptide pediocin PA-1 ». *Applied and environmental microbiology* 66.11, pages 4798–4802.
- JOHNSEN, Line, Gunnar FIMLAND, Dimitris MANTZILAS et Jon NISSEN-MEYER (2004). « Structure-function analysis of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins : C-terminal parts of immunity proteins are involved in specific recognition of cognate bacteriocins ». *Applied and environmental microbiology* 70.5, pages 2647–2652.
- JOLY, J. C. et J. R. SWARTZ (1997). « In vitro and in vivo redox states of the *Escherichia coli* periplasmic oxidoreductases DsbA and DsbC ». *Biochemistry* 36.33, pages 10067–10072.
- JOLY, J. C., W. S. LEUNG et J. R. SWARTZ (1998). « Overexpression of *Escherichia coli* oxidoreductases increases recombinant insulin-like growth factor-I accumulation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95.6, pages 2773–2777.
- JØRGENSEN, Casper M., Astrid VRANG et Søren M. MADSEN (2014). « Recombinant protein expression in *Lactococcus lactis* using the P170 expression system ». *FEMS microbiology letters* 351.2, pages 170–178.
- KADOKURA, Hiroshi, Federico KATZEN et Jon BECKWITH (2003). « Protein disulfide bond formation in prokaryotes ». *Annual review of biochemistry* 72, pages 111–135.
- KAISER, A L et T J MONTVILLE (1996). « Purification of the bacteriocin bavaricin MN and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipid vesicles. » *Applied and Environmental Microbiology* 62.12, pages 4529–4535.
- KANATANI, K., M. OSHIMURA et K. SANO (1995). « Isolation and characterization of acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *Lactobacillus acidophilus* ». *Applied and Environmental Microbiology* 61.3, pages 1061–1067.
- KAUR, Kamaljit, Lena C ANDREW, David S WISHART et John C VEDERAS (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* 43.28, pages 9009–9020.
- KAWAMOTO, Shinichi *et al.* (2002). « Biochemical and genetic characterization of mundticin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7393 ». *Applied and Environmental Microbiology* 68.8, pages 3830–3840.
- KAZAZIC, Maja, Jon NISSEN-MEYER et Gunnar FIMLAND (2002). « Mutational analysis of the role of charged residues in target-cell binding, potency and specificity of the pediocin-like bacteriocin sakacin P ». *Microbiology (Reading, England)* 148 (Pt 7), pages 2019–2027.
- KEMPERMAN, Rober, Anneke KUIPERS, Harma KARSENS, Arjen NAUTA, Oscar KUIPERS et Jan KOK (2003). « Identification and Characterization of Two Novel Clostridial Bacteriocins, Circularin A and Closticin 574 ». *Applied and Environmental Microbiology* 69.3, pages 1589–1597.
- KISHIGAMI, Satoshi, Yoshinori AKIYAMA et Koreaki ITO (1995). « Redox states of DsbA in the periplasm of *Escherichia coli* ». *FEBS Letters* 364.1, pages 55–58.
- KJOS, Morten, Ingolf F NES et Dzung B DIEP (2009). « Class II one-peptide bacteriocins target a phylogenetically defined subgroup of mannose phosphotransferase systems on sensitive cells ». *Microbiology (Reading, England)* 155 (Pt 9), pages 2949–2961.

- KJOS, Morten, Zhian SALEHIAN, Ingolf F. NES et Dzung B. DIEP (2010). « An extracellular loop of the mannose phosphotransferase system component IIC is responsible for specific targeting by class IIa bacteriocins ». *Journal of Bacteriology* 192.22, pages 5906–5913.
- KJOS, Morten *et al.* (2011). « Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria ». *Microbiology (Reading, England)* 157 (Pt 12), pages 3256–3267.
- KLAENHAMMER, T R (1988). « Bacteriocins of lactic acid bacteria ». *Biochimie* 70.3, pages 337–349.
- KLAENHAMMER, T R (1993). « Genetics of Bacteriocins Produced by Lactic-Acid Bacteria ». *Fems Microbiology Reviews* 12.1, pages 39–86.
- KLEEREBEZEM, M., M. M. BEERTHUYZEN, E. E. VAUGHAN, W. M. de VOS et O. P. KUIPERS (1997). « Controlled gene expression systems for lactic acid bacteria : transferable nisin-inducible expression cassettes for *Lactococcus*, *Leuconostoc*, and *Lactobacillus* spp ». *Applied and Environmental Microbiology* 63.11, pages 4581–4584.
- KLEEREBEZEM, M., O. P. KUIPERS, W. M. de VOS, M. E. STILES et L. E. QUADRI (2001). « A two-component signal-transduction cascade in *Carnobacterium piscicola* LV17B : two signaling peptides and one sensor-transmitter ». *Peptides* 22.10, pages 1597–1601.
- KLOCKE, Michael, Kerstin MUNDT, Frank IDLER, Sabrina JUNG et Jan E BACKHAUSEN (2005). « Heterologous expression of enterocin A, a bacteriocin from *Enterococcus faecium*, fused to a cellulose-binding domain in *Escherichia coli* results in a functional protein with inhibitory activity against *Listeria* ». *Applied microbiology and biotechnology* 67.4, pages 532–538.
- KOUWEN, Thijs R. H. M. *et al.* (2007). « Thiol-disulphide oxidoreductase modules in the low-GC Gram-positive bacteria ». *Molecular Microbiology* 64.4, pages 984–999.
- KOUWEN, Thijs R. H. M., Jean-Yves F. DUBOIS, Roland FREUDL, Wim J. QUAX et Jan Maarten van DIJL (2008). « Modulation of Thiol-Disulfide Oxidoreductases for Increased Production of Disulfide-Bond-Containing Proteins in *Bacillus subtilis* ». *Applied and Environmental Microbiology* 74.24, pages 7536–7545.
- KRUSZEWSKA, Danuta, Hans-Georg SAHL, Gabriele BIERBAUM, Ulrike PAG, Sean O HYNES et Asa LJUNGH (2004). « Mersacidin eradicates methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a mouse rhinitis model ». *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 54.3, pages 648–653.
- KUIPERS, Anneke *et al.* (2006). « Sec-mediated transport of posttranslationally dehydrated peptides in *Lactococcus lactis* ». *Applied and environmental microbiology* 72.12, pages 7626–7633.
- KUIPERS, Anneke, Rick RINK et Gert N. MOLL (2011). « Genetics, Biosynthesis, Structure, and Mode of Action of Lantibiotics ». *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*. Sous la direction de Djamel DRIDER et Sylvie REBUFFAT. Springer New York, pages 147–169.
- KUIPERS, O. P., M. M. BEERTHUYZEN, P. G. de RUYTER, E. J. LUESINK et W. M. de VOS (1995). « Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction ». *The Journal of Biological Chemistry* 270.45, pages 27299–27304.

- KUIPERS, Oscar P, Pascalle G.G.A de RUYTER, Michiel KLEEREBEZEM et Willem M de VOS (1998). « Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria ». *Journal of Biotechnology* 64.1, pages 15–21.
- KUROKAWA, Y., H. YANAGI et T. YURA (2001). « Overproduction of bacterial protein disulfide isomerase (DsbC) and its modulator (DsbD) markedly enhances periplasmic production of human nerve growth factor in *Escherichia coli* ». *The Journal of Biological Chemistry* 276.17, pages 14393–14399.
- LE LOIR, Y, A GRUSS, S D EHRLICH et P LANGELLA (1998). « A nine-residue synthetic propeptide enhances secretion efficiency of heterologous proteins in *Lactococcus lactis* ». *Journal of bacteriology* 180.7, pages 1895–1903.
- LE LOIR, Y, S NOUAILLE, J COMMISSAIRE, L BRÉTIGNY, A GRUSS et P LANGELLA (2001). « Signal peptide and propeptide optimization for heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis* ». *Applied and environmental microbiology* 67.9, pages 4119–4127.
- LE LOIR, Yves *et al.* (2005). « Protein secretion in *Lactococcus lactis* : an efficient way to increase the overall heterologous protein production ». *Microbial cell factories* 4.1, page 2.
- LEER, R. J., J. M. van der VOSSEN, M. van GIEZEN, J. M. van NOORT et P. H. POWELS (1995). « Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* ». *Microbiology (Reading, England)* 141 (Pt 7), pages 1629–1635.
- LEISNER, Jørgen J., Birgit Groth LAURSEN, Hervé PRÉVOST, Djamel DRIDER et Paw DALGAARD (2007). « *Carnobacterium* : positive and negative effects in the environment and in foods ». *FEMS Microbiology Reviews* 31.5, pages 592–613.
- LEROY, F. et L. de VUYST (1999). « Temperature and pH conditions that prevail during fermentation of sausages are optimal for production of the antilisterial bacteriocin sakacin K ». *Applied and Environmental Microbiology* 65.3, pages 974–981.
- LI, Ruiqing, Timo M TAKALA, Mingqiang QIAO, Haijin XU et Per E J SARIS (2011). « Nisin-selectable food-grade secretion vector for *Lactococcus lactis* ». *Biotechnology letters* 33.4, pages 797–803.
- LIEBETON, K., A. ZACHARIAS et K. E. JAEGER (2001). « Disulfide bond in *Pseudomonas aeruginosa* lipase stabilizes the structure but is not required for interaction with its foldase ». *Journal of Bacteriology* 183.2, pages 597–603.
- LINDHOLM, Agneta, Andreas SMEDS et Airi PALVA (2004). « Receptor binding domain of *Escherichia coli* F18 fimbrial adhesin FedF can be both efficiently secreted and surface displayed in a functional form in *Lactococcus lactis* ». *Applied and Environmental Microbiology* 70.4, pages 2061–2071.
- LIU, Shan-na, Ye HAN et Zhi-jiang ZHOU (2011). « Fusion expression of pedA gene to obtain biologically active pediocin PA-1 in *Escherichia coli* ». *Journal of Zhejiang University. Science. B* 12.1, pages 65–71.
- LOHANS, Christopher T. et John C. VEDERAS (2014). « Structural characterization of thioether-bridged bacteriocins ». *The Journal of Antibiotics* 67.1, pages 23–30.
- MAFTAH, A. *et al.* (1993). « Membrane permeabilization of *Listeria monocytogenes* and mitochondria by the bacteriocin mesentericin Y105 ». *Journal of Bacteriology* 175.10, pages 3232–3235.
- MAKRIDES, S C (1996). « Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. » *Microbiological Reviews* 60.3, pages 512–538.

- MAQUEDA, Mercedes, Marina SÁNCHEZ-HIDALGO, Matilde FERNÁNDEZ, Manuel Montalbán LÓPEZ, Eva VALDIVIA et Manuel MARTÍNEZ-BUENO (2008). « Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria ». *FEMS Microbiology Reviews* 32.1, pages 2–22.
- MARTÍN, María, Jorge GUTIÉRREZ, Raquel CRIADO, Carmen HERRANZ, Luis M. CINTAS et Pablo E. HERNÁNDEZ (2007a). « Chimeras of mature pediocin PA-1 fused to the signal peptide of enterocin P permits the cloning, production, and expression of pediocin PA-1 in *Lactococcus lactis* ». *Journal of Food Protection* 70.12, pages 2792–2798.
- MARTÍN, María, Jorge GUTIÉRREZ, Raquel CRIADO, Carmen HERRANZ, Luis M. CINTAS et Pablo E. HERNÁNDEZ (2007b). « Cloning, production and expression of the bacteriocin enterocin A produced by *Enterococcus faecium* PLBC21 in *Lactococcus lactis* ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 76.3, pages 667–675.
- MARTÍNEZ, J M *et al.* (1998). « Generation of polyclonal antibodies of predetermined specificity against pediocin PA-1 ». *Applied and environmental microbiology* 64.11, pages 4536–4545.
- MARTÍNEZ, J M, J KOK, J W SANDERS et P E HERNÁNDEZ (2000). « Heterologous coproduction of enterocin A and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis* : detection by specific peptide-directed antibodies ». *Applied and environmental microbiology* 66.8, pages 3543–3549.
- MARUGG, J D *et al.* (1992). « Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, and bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0 ». *Applied and environmental microbiology* 58.8, pages 2360–2367.
- MASUDA, Shinji, Chen DONG, Danielle SWEM, Aaron T. SETTERDAHL, David B. KNAFF et Carl E. BAUER (2002). « Repression of photosynthesis gene expression by formation of a disulfide bond in CrtJ ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99.10, pages 7078–7083.
- MATHIEU, F., M. MICHEL et G. LEFEBVRE (1993). « Properties of a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* CP5 ». *Biotechnology Letters* 15.6, pages 587–590.
- MATTICK, A T R et A HIRSCH (1947). « Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic *streptococci* ». *Lancet* 2.6462, pages 5–8.
- MEINDL, Kathrin *et al.* (2010). « Labyrinthopeptins : a new class of carbacyclic lantibiotics ». *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 49.6, pages 1151–1154.
- MIERAU, Igor (2007). « *Lactococcus lactis* in the 21st Century ». *BIOforum Europe*.
- MIERAU, Igor et Michiel KLEEREBEZEM (2005). « 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis* ». *Applied microbiology and biotechnology* 68.6, pages 705–717.
- MIERAU, Igor, Kees OLIEMAN, James MOND et Eddy J SMID (2005). « Optimization of the *Lactococcus lactis* nisin-controlled gene expression system NICE for industrial applications ». *Microbial cell factories* 4, page 16.
- MILLER, A., M. E. MORGAN et L. M. LIBBEY (1974). « *Lactobacillus maltaromicus*, a New Species Producing a Malty Aroma ». *International Journal of Systematic Bacteriology* 24.3, pages 346–354.

- MILLER, K W, R SCHAMBER, O OSMANAGAOGLU et B RAY (1998a). « Isolation and characterization of pediocin AcH chimeric protein mutants with altered bactericidal activity ». *Applied and environmental microbiology* 64.6, pages 1997–2005.
- MILLER, K W, R SCHAMBER, Y CHEN et B RAY (1998b). « Production of active chimeric pediocin AcH in *Escherichia coli* in the absence of processing and secretion genes from the *Pediococcus* pap operon ». *Applied and environmental microbiology* 64.1, pages 14–20.
- MISSIAKAS, D., C. GEORGOPOULOS et S. RAINA (1994). « The *Escherichia coli* dsbC (xprA) gene encodes a periplasmic protein involved in disulfide bond formation ». *The EMBO journal* 13.8, pages 2013–2020.
- MOON, Gi-Seong, Yu-Ryang PYUN, Myeong Soo PARK, Geun Eog Ji et Wang June KIM (2005). « Secretion of Recombinant Pediocin PA-1 by *Bifidobacterium longum*, Using the Signal Sequence for Bifidobacterial α -Amylase ». *Applied and Environmental Microbiology* 71.9, pages 5630–5632.
- MOON, Gi-Seong, Yu-Ryang PYUN et Wang June KIM (2006). « Expression and purification of a fusion-typed pediocin PA-1 in *Escherichia coli* and recovery of biologically active pediocin PA-1 ». *International Journal of Food Microbiology* 108.1, pages 136–140.
- MORELLO, E *et al.* (2008). « *Lactococcus lactis*, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion ». *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 14.1, pages 48–58.
- MORI, Hiroyuki et Koreaki ITO (2001). « The Sec protein-translocation pathway ». *Trends in Microbiology* 9.10, pages 494–500.
- MORISSET, Dany et Jacques FRÈRE (2002). « Heterologous expression of bacteriocins using the mesentericin Y105 dedicated transport system by *Leuconostoc mesenteroides* ». *Biochimie* 84.5, pages 569–576.
- MORISSET, Dany, Jean-Marc BERJEAUD, Didier MARION, Christian LACOMBE et Jacques FRÈRE (2004). « Mutational analysis of mesentericin y105, an anti-*Listeria* bacteriocin, for determination of impact on bactericidal activity, in vitro secondary structure, and membrane interaction ». *Applied and environmental microbiology* 70.8, pages 4672–4680.
- MOTTA, Amanda S., Fabiana S. FLORES, André A. SOUTO et Adriano BRANDELLI (2008). « Antibacterial activity of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus* sp. P34 that targets the bacterial cell envelope ». *Antonie van Leeuwenhoek* 93.3, pages 275–284.
- MÉTIVIER, A. *et al.* (1998). « Divercin V41, a new bacteriocin with two disulphide bonds produced by *Carnobacterium divergens* V41 : primary structure and genomic organization ». *Microbiology (Reading, England)* 144 (Pt 10), pages 2837–2844.
- MURIANA, P M et T R KLAENHAMMER (1991). « Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. » *Applied and Environmental Microbiology* 57.1, pages 114–121.
- NAGHMOUCHI, K., D. DRIDER, E. KHEADR, C. LACROIX, H. PRÉVOST et I. FLISS (2006). « Multiple characterizations of *Listeria monocytogenes* sensitive and insensitive variants to divergicin M35, a new pediocin-like bacteriocin ». *Journal of Applied Microbiology* 100.1, pages 29–39.

- NAGHMOUCHI, Karim, Djamel DRIDER et Ismail FLISS (2008). « Purification of pediocin PA-1 by immunoaffinity chromatography ». *Journal of AOAC International* 91.4, pages 828–832.
- NAGHMOUCHI, Karim, Djamel DRIDER, John BAAH et Teather RON (2010). « Nisin A and polymyxin B as synergistic inhibitors of Gram-positive and Gram-negative bacteria ». *Probiotics Antimicrobial Proteins* 1.2, pages 98–103.
- NAGHMOUCHI, Karim, Y BELGUESMIA, John BAAH, Teather RON et Djamel DRIDER (2011). « Antibacterial activity of class I and IIa bacteriocins combined with polymyxin E against resistant variants of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* ». *Research in Microbiology* 162.2, pages 99–107.
- NES, I F, D B DIEP, L S HÅVARSTEIN, M B BRURBERG, V EIJSINK et H HOLO (1996). « Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria ». *Antonie van Leeuwenhoek* 70.2, pages 113–128.
- NES, Ingolf F. (2011). « History, Current Knowledge, and Future Directions on Bacteriocin Research in Lactic Acid Bacteria ». *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*. Sous la direction de Djamel DRIDER et Sylvie REBUFFAT. Springer New York, pages 3–12.
- NEU, H C (1992). « The crisis in antibiotic resistance ». *Science (New York, N.Y.)* 257.5073, pages 1064–1073.
- NIELSEN, H., J. ENGELBRECHT, S. BRUNAK et G. von HEIJNE (1997). « Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites ». *Protein Engineering* 10.1, pages 1–6.
- NISSEN-MEYER, J, P ROGNE, C OPPEGÅRD, H S HAUGEN et P E KRISTIANSEN (2009). « Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria ». *Current pharmaceutical biotechnology* 10.1, pages 19–37.
- OBIS, David, Alain GUILLOT et Michel Yves MISTOU (2001). « Tolerance to high osmolality of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *cremoris* is related to the activity of a betaine transport system ». *FEMS Microbiology Letters* 202.1, pages 39–44.
- OMAN, Trent J., John M. BOETTCHE, Huan WANG, Xenia N. OKALIBE et Wilfred A. van der DONK (2011). « Sublancin is not a lantibiotic but an S-linked glycopeptide ». *Nature chemical biology* 7.2, pages 78–80.
- OPPEGÅRD, Camilla, Per ROGNE, Linda EMANUELSEN, Per Eugen KRISTIANSEN, Gunnar FIMLAND et Jon NISSEN-MEYER (2007). « The two-peptide class II bacteriocins : structure, production, and mode of action ». *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 13.4, pages 210–219.
- OSMANAGAOGLU, Ozlem, Fadime KIRAN et Haluk ATAOGU (2010). « Evaluation of *in vitro* Probiotic Potential of *Pediococcus pentosaceus* OZF Isolated from Human Breast Milk ». *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 2.3, pages 162–174.
- O’SULLIVAN, D J et T R KLAENHAMMER (1993). « Rapid Mini-Prep Isolation of High-Quality Plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. ». *Applied and environmental microbiology* 59.8, pages 2730–2733.
- PAIK, S. H., A. CHAKICHERLA et J. N. HANSEN (1998). « Identification and characterization of the structural and transporter genes for, and the chemical and biological properties of, sublancin 168, a novel lantibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168 ». *The Journal of Biological Chemistry* 273.36, pages 23134–23142.

- PAPAGIANNI, Maria et Sofia ANASTASIADOU (2009). « Pediocins : The bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications ». *Microbial cell factories* 8, page 3.
- PAPAGIANNI, Maria, Nicholas AVRAMIDIS et George FILIOUSSIS (2007). « High efficiency electrotransformation of *Lactococcus lactis* spp. *lactis* cells pretreated with lithium acetate and dithiothreitol ». *BMC Biotechnology* 7.1, page 15.
- PARENTE, E. et A. RICCIARDI (1999). « Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 52.5, pages 628–638.
- PASTEUR, Louis (1877). « Charbon et septicémie ». *Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales* 85. Avec la collaboration de Jean-François JOUBERT, pages 101–115.
- PAVAN, S. *et al.* (2000). « Adaptation of the nisin-controlled expression system in *Lactobacillus plantarum* : a tool to study in vivo biological effects ». *Applied and Environmental Microbiology* 66.10, pages 4427–4432.
- PIPER, Clare, Paul D COTTER, R Paul ROSS et Colin HILL (2009). « Discovery of medically significant lantibiotics ». *Current drug discovery technologies* 6.1, pages 1–18.
- PONTES, Daniela Santos, Marcela Santiago Pacheco de AZEVEDO, Jean-Marc CHATEL, Philippe LANGELLA, Vasco AZEVEDO et Anderson MIYOSHI (2011). « *Lactococcus lactis* as a live vector : Heterologous protein production and DNA delivery systems ». *Protein Expression and Purification* 79.2, pages 165–175.
- POQUET, I., S. D. EHRLICH et A. GRUSS (1998). « An export-specific reporter designed for gram-positive bacteria : application to *Lactococcus lactis* ». *Journal of Bacteriology* 180.7, pages 1904–1912.
- PROBA, K., L. GE et A. PLÜCKTHUN (1995). « Functional antibody single-chain fragments from the cytoplasm of *Escherichia coli* : influence of thioredoxin reductase (TrxB) ». *Gene* 159.2, pages 203–207.
- QUADRI, L. E. (2003). « Regulation of Class II Bacteriocin Production by Cell-Cell Signaling ». *Journal of Microbiology (Seoul)* 41.3, pages 175–182.
- QUADRI, L. E., M. SAILER, K. L. ROY, J. C. VEDERAS et M. E. STILES (1994). « Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B ». *The Journal of Biological Chemistry* 269.16, pages 12204–12211.
- QUADRI, L E, L Z YAN, M E STILES et J C VEDERAS (1997). « Effect of amino acid substitutions on the activity of carnobacteriocin B2. Overproduction of the antimicrobial peptide, its engineered variants, and its precursor in *Escherichia coli* ». *The Journal of biological chemistry* 272.6, pages 3384–3388.
- QUE, Y A, J A HAEFLIGER, P FRANCIOLI et P MOREILLON (2000). « Expression of *Staphylococcus aureus* clumping factor A in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* using a new shuttle vector ». *Infection and immunity* 68.6, pages 3516–3522.
- QUEVILLON, E. *et al.* (2005). « InterProScan : protein domains identifier ». *Nucleic Acids Research* 33 (suppl 2), W116–W120.
- RAHMAN, Abdur *et al.* (2014). « High genetic diversity among strains of the unindustrialized lactic acid bacterium *Carnobacterium maltaromaticum* in dairy products as revealed by multilocus sequence typing ». *Applied and Environmental Microbiology* 80.13, pages 3920–3929.

- RAI, Meena et Harish PADH (2001). « Expression systems for production of heterologous proteins ». *Current Science* 80.9, pages 1121–1128.
- RAMNATH, Manilduth, Safia AROUS, Anne GRAVESEN, John W. HASTINGS et Yann HÉCHARD (2004). « Expression of mptC of *Listeria monocytogenes* induces sensitivity to class IIa bacteriocins in *Lactococcus lactis* ». *Microbiology (Reading, England)* 150 (Pt 8), pages 2663–2668.
- RAVN, Peter, José ARNAU, Søren M. MADSEN, Astrid VRANG et Hans ISRAELSEN (2000). « The development of TnNuc and its use for the isolation of novel secretion signals in *Lactococcus lactis* ». *Gene* 242.1, pages 347–356.
- REA, Mary C., R. Paul ROSS, Paul D. COTTER et Colin HILL (2011). « Classification of Bacteriocins from Gram-Positive Bacteria ». *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*. Sous la direction de Djamel DRIDER et Sylvie REBUFFAT. Springer New York, pages 29–53.
- REENEN, C. A. van, L. M. DICKS et M. L. CHIKINDAS (1998). « Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ». *Journal of Applied Microbiology* 84.6, pages 1131–1137.
- RENYE Jr, J A et G A SOMKUTI (2010). « Nisin-induced expression of pediocin in dairy lactic acid bacteria ». *Journal of applied microbiology* 108.6, pages 2142–2151.
- RENYE, J.A., G.A. SOMKUTI, J.I. GARABAL et L. DU (2011). « Heterologous production of pediocin for the control of *Listeria monocytogenes* in dairy foods ». *Food Control* 22.12, pages 1887–1892.
- REVIRIEGO, C. *et al.* (2005). « Production of pediocin PA-1, and coproduction of nisin A and pediocin PA-1, by wild *Lactococcus lactis* strains of dairy origin ». *International Dairy Journal* 15.1, pages 45–49.
- REVIRIEGO, C., L. FERNÁNDEZ et J. M. RODRÍGUEZ (2007a). « A food-grade system for production of pediocin PA-1 in nisin-producing and non-nisin-producing *Lactococcus lactis* strains : application to inhibit *Listeria* growth in a cheese model system ». *Journal of Food Protection* 70.11, pages 2512–2517.
- REVIRIEGO, C., L. FERNÁNDEZ, O.P. KUIPERS, J. KOK et J.M. RODRÍGUEZ (2007b). « Enhanced production of pediocin PA-1 in wild nisin- and non-nisin-producing *Lactococcus lactis* strains of dairy origin ». *International Dairy Journal* 17.5, pages 574–577.
- RICHARD, Christelle, Djamel DRIDER, Khalil ELMORJANI, Didier MARION et Hervé PRÉVOST (2004). « Heterologous expression and purification of active divercin V41, a class IIa bacteriocin encoded by a synthetic gene in *Escherichia coli* ». *Journal of bacteriology* 186.13, pages 4276–4284.
- RIEDEL, Christian U. *et al.* (2007). « Improved Luciferase Tagging System for *Listeria monocytogenes* Allows Real-Time Monitoring In Vivo and In Vitro ». *Applied and Environmental Microbiology* 73.9, pages 3091–3094.
- RIESENBERG, D et R GUTHKE (1999). « High-cell-density cultivation of microorganisms ». *Applied microbiology and biotechnology* 51.4, pages 422–430.
- RIETSCH, A., P. BESSETTE, G. GEORGIOU et J. BECKWITH (1997). « Reduction of the periplasmic disulfide bond isomerase, DsbC, occurs by passage of electrons from cytoplasmic thioredoxin ». *Journal of Bacteriology* 179.21, pages 6602–6608.
- RIHAKOVA, Jitka, Vanessa W. PETIT, Katerina DEMNEROVA, Herve PREVOST, Sylvie REBUFFAT et Djamel DRIDER (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* 75.7, pages 1811–1819.
- RIHAKOVA, Jitka *et al.* (2010). « In Vivo Activities of Recombinant Divercin V41 and Its Structural Variants against *Listeria monocytogenes* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54.1, pages 563–564.
- RILEY, M.A. (2009). « Bacteriocins, Biology, Ecology, and Evolution ». *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*. Sous la direction de Moselio SCHAECHTER. Oxford : Academic Press, pages 32–44.
- RODRÍGUEZ, J M, M I MARTÍNEZ, N HORN et H M DODD (2003). « Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria ». *International journal of food microbiology* 80.2, pages 101–116.
- RODRÍGUEZ, Juan M, María I MARTÍNEZ et Jan KOK (2002). « Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria ». *Critical reviews in food science and nutrition* 42.2, pages 91–121.
- RODRIGUEZ, E., J. CALZADA, J.L. ARQUÉS, J.M. RODRIGUEZ, M. NUNEZ et M. MEDINA (2005). « Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157 :H7 in cheese ». *International Dairy Journal* 15.1, pages 51–57.
- ROGERS, L. A. et E. O. WHITTIER (1928). « Limiting factors in the lactic fermentation ». *Journal of Bacteriology* 16.4, pages 211–229.
- ROHDE, Bettina H et Luis EN QUADRI (2006). « Functional characterization of a three-component regulatory system involved in quorum sensing-based regulation of peptide antibiotic production in *Carnobacterium maltaromaticum* ». *BMC Microbiology* 6, page 93.
- RUDDOCK, L W, T R HIRST et R B FREEDMAN (1996). « pH-dependence of the dithiol-oxidizing activity of DsbA (a periplasmic protein thiol :disulphide oxidoreductase) and protein disulphide-isomerase : studies with a novel simple peptide substrate. » *Biochemical Journal* 315 (Pt 3), pages 1001–1005.
- RUYTER, P G de, O P KUIPERS et W M de VOS (1996). « Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin ». *Applied and environmental microbiology* 62.10, pages 3662–3667.
- RYAN, M. P., J. FLYNN, C. HILL, R. P. ROSS et W. J. MEANEY (1999). « The Natural Food Grade Inhibitor, Lacticin 3147, Reduced the Incidence of Mastitis After Experimental Challenge with *Streptococcus dysgalactiae* in Nonlactating Dairy Cows ». *Journal of Dairy Science* 82.10, pages 2108–2114.
- SAAVEDRA, Lucila et Fernando SESMA (2011). « Purification Techniques of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria and Other Gram-Positive Bacteria ». *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*. Sous la direction de Djamel DRIDER et Sylvie REBUFFAT. Springer New York, pages 99–113.
- SARVAS, Matti, Colin R. HARWOOD, Sierd BRON et Jan Maarten van DIJL (2004). « Post-translocational folding of secretory proteins in Gram-positive bacteria ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1694.1, pages 311–327.
- SCHÄGGER, Hermann (2006). « Tricine-SDS-PAGE ». *Nature protocols* 1.1, pages 16–22.

- SCHMIDT, F. R. (2004). « Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 65.4, pages 363–372.
- SCHMIDT, F. R. (2005). « Optimization and scale up of industrial fermentation processes ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 68.4, pages 425–435.
- SCHOEMAN, Heidi, Melané A. VIVIER, Maret du TOIT, Leon M. T. DICKS et Isak S. PRETORIUS (1999). « The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (pedA) in *Saccharomyces cerevisiae* ». *Yeast* 15.8, pages 647–656.
- SENES, Alessandro, Donald E ENGEL et William F DEGRADO (2004). « Folding of helical membrane proteins : the role of polar, GxxxG-like and proline motifs ». *Current Opinion in Structural Biology* 14.4, pages 465–479.
- SHEVCHIK, V. E., G. CONDEMINÉ et J. ROBERT-BAUDOUY (1994). « Characterization of DsbC, a periplasmic protein of *Erwinia chrysanthemi* and *Escherichia coli* with disulfide isomerase activity ». *The EMBO journal* 13.8, pages 2007–2012.
- SIMON, L., C. FREMAUX, Y. CENATIEMPO et J. M. BERJEAUD (2002). « Sakacin G, a New Type of Antilisterial Bacteriocin ». *Applied and Environmental Microbiology* 68.12, pages 6416–6420.
- SÁNCHEZ, Jorge *et al.* (2008). « Cloning and heterologous production of Hiracin JM79, a Sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, in lactic acid bacteria and *Pichia pastoris* ». *Applied and environmental microbiology* 74.8, pages 2471–2479.
- SONG, D F, X LI, Y H ZHANG, M Y ZHU et Q GU (2013). « Mutational analysis of positively charged residues in the N-terminal region of the class IIa bacteriocin pediocin PA-1 ». *Letters in applied microbiology*.
- SOSUNOV, Vasily *et al.* (2007). « Antimycobacterial activity of bacteriocins and their complexes with liposomes ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59.5, pages 919–925.
- SPRULES, Tara, Karen E. KAWULKA, Alan C. GIBBS, David S. WISHART et John C. VEDERAS (2004). « NMR solution structure of the precursor for carnobacteriocin B2, an antimicrobial peptide from *Carnobacterium piscicola* ». *European journal of biochemistry / FEBS* 271.9, pages 1748–1756.
- STEPPER, Judith *et al.* (2011). « Cysteine S-glycosylation, a new post-translational modification found in glycopeptide bacteriocins ». *FEBS Letters* 585.4, pages 645–650.
- STRAATEN, Monique van, Dominique MISSIAKAS, Satish RAINA et Nigel J. DARBY (1998). « The functional properties of DsbG, a thiol-disulfide oxidoreductase from the periplasm of *Escherichia coli* ». *FEBS Letters* 428.3, pages 255–258.
- SUZUKI, M., T. YAMAMOTO, Y. KAWAI, N. INOUE et K. YAMAZAKI (2005). « Mode of action of piscicocin CS526 produced by *Carnobacterium piscicola* CS526 ». *Journal of Applied Microbiology* 98.5, pages 1146–1151.
- TAHIRI, I. *et al.* (2004). « Purification, characterization and amino acid sequencing of divergicin M35 : a novel class IIa bacteriocin produced by *Carnobacterium divergens* M35 ». *International Journal of Food Microbiology* 97.2, pages 123–136.
- TERPE, K. (2003). « Overview of tag protein fusions : from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 60.5, pages 523–533.

- TERPE, Kay (2006). « Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production : from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 72.2, pages 211–222.
- TESSEMA, Girum Tadesse, Trond MØRETRØ, Achim KOHLER, Lars AXELSSON et Kristine NATERSTAD (2009). « Complex phenotypic and genotypic responses of *Listeria monocytogenes* strains exposed to the class IIa bacteriocin sakacin P ». *Applied and Environmental Microbiology* 75.22, pages 6973–6980.
- THIRY, Michel et Dorian CINGOLANI (2002). « Optimizing scale-up fermentation processes ». *Trends in Biotechnology* 20.3, pages 103–105.
- THÖNY-MEYER, L., F. FISCHER, P. KÜNZLER, D. RITZ et H. HENNECKE (1995). « *Escherichia coli* genes required for cytochrome c maturation ». *Journal of Bacteriology* 177.15, pages 4321–4326.
- UNIPROT CONSORTIUM (2014). « Activities at the Universal Protein Resource (UniProt) ». *Nucleic Acids Research* 42 (Database issue), pages D191–198.
- UTENG, Marianne, Håvard Hildeng HAUGE, Ilia BRONDZ, Jon NISSEN-MEYER et Gunnar FIMLAND (2002). « Rapid Two-Step Procedure for Large-Scale Purification of Pediocin-Like Bacteriocins and Other Cationic Antimicrobial Peptides from Complex Culture Medium ». *Applied and Environmental Microbiology* 68.2, pages 952–956.
- UTENG, Marianne *et al.* (2003). « Three-Dimensional Structure in Lipid Micelles of the Pediocin-like Antimicrobial Peptide Sakacin P and a Sakacin P Variant That Is Structurally Stabilized by an Inserted C-Terminal Disulfide Bridge† ». *Biochemistry* 42.39, pages 11417–11426.
- VADYVALOO, Viveka, John W. HASTINGS, Marthinus J. van der MERWE et Marina RAUTENBACH (2002). « Membranes of class IIa bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* cells contain increased levels of desaturated and short-acyl-chain phosphatidylglycerols ». *Applied and Environmental Microbiology* 68.11, pages 5223–5230.
- VADYVALOO, Viveka *et al.* (2004). « Cell-surface alterations in class IIa bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* strains ». *Microbiology (Reading, England)* 150 (Pt 9), pages 3025–3033.
- VAN REENEN, C.A, M.L CHIKINDAS, W.H VAN ZYL et L.M.T DICKS (2003). « Characterization and heterologous expression of a class IIa bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae* ». *International Journal of Food Microbiology* 81.1, pages 29–40.
- VENEMA, K *et al.* (1995). « Functional analysis of the pediocin operon of *Pediococcus acidilactici* PAC1.0 : PedB is the immunity protein and PedD is the precursor processing enzyme ». *Molecular microbiology* 17.3, pages 515–522.
- VENEMA, K. *et al.* (1997). « Rapid and Efficient Purification Method for Small, Hydrophobic, Cationic Bacteriocins : Purification of Lactococcin B and Pediocin PA-1 ». *Applied and Environmental Microbiology* 63.1, pages 305–309.
- VOSSEN, J M van der, D van der LELIE et G VENEMA (1987). « Isolation and characterization of *Streptococcus cremoris* Wg2-specific promoters ». *Applied and environmental microbiology* 53.10, pages 2452–2457.
- VU-KHAC, Hung et Kurt W. MILLER (2009). « Regulation of mannose phosphotransferase system permease and virulence gene expression in *Listeria monocytogenes* by the

- EII(t)Man transporter ». *Applied and Environmental Microbiology* 75.21, pages 6671–6678.
- WAN, Xing, Ruiqing LI, Per E J SARIS et Timo M TAKALA (2013). « Genetic characterisation and heterologous expression of leucocin C, a class IIa bacteriocin from *Leuconostoc carnosum* 4010 ». *Applied microbiology and biotechnology* 97.8, pages 3509–3518.
- WANDERSMAN, C. (1998). « Protein and peptide secretion by ABC exporters ». *Research in Microbiology* 149.3, pages 163–170.
- WANG, Qing, Wenjuan FU, Qingshan MA, Zhanqiao YU et Rijun ZHANG (2013). « Production of bacteriocin E50-52 by small ubiquitin-related modifier fusion in *Escherichia coli* ». *Polish journal of microbiology / Polskie Towarzystwo Mikrobiologów = The Polish Society of Microbiologists* 62.4, pages 345–350.
- WANG, Y. *et al.* (1999). « Solution structure of carnobacteriocin B2 and implications for structure-activity relationships among type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria ». *Biochemistry* 38.47, pages 15438–15447.
- WELY, Karel H. M. van, Jelto SWAVING, Roland FREUDL et Arnold J. M. DRIESSEN (2001). « Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria ». *FEMS Microbiology Reviews* 25.4, pages 437–454.
- WHITEHEAD, Hugh Robinson (1933). « A substance inhibiting bacterial growth, produced by certain strains of lactic streptococci ». *Biochemical Journal* 27.6, pages 1793–1800.
- WILLEY, Joanne M et Wilfred A van der DONK (2007). « Lantibiotics : peptides of diverse structure and function ». *Annual review of microbiology* 61, pages 477–501.
- WIMLEY, William C. (2010). « Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model ». *ACS chemical biology* 5.10, pages 905–917.
- WINTER, J., P. NEUBAUER, R. GLOCKSHUBER et R. RUDOLPH (2000). « Increased production of human proinsulin in the periplasmic space of *Escherichia coli* by fusion to DsbA ». *Journal of Biotechnology* 84.2, pages 175–185.
- WOODCOCK, D M *et al.* (1989). « Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants ». *Nucleic Acids Research* 17.9, pages 3469–3478.
- WOROBO, R W, M J VAN BELKUM, M SAILER, K L ROY, J C VEDERAS et M E STILES (1995). « A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens* ». *Journal of bacteriology* 177.11, pages 3143–3149.
- WU, Dan *et al.* (2010). « Incomplete formation of intramolecular disulfide bond triggers degradation and aggregation of human consensus interferon- α mutant by *Pichia pastoris* ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 85.6, pages 1759–1767.
- XUE, Junfeng, Ian HUNTER, Tori STEINMETZ, Adam PETERS, Bibek RAY et Kurt W. MILLER (2005). « Novel activator of mannose-specific phosphotransferase system permease expression in *Listeria innocua*, identified by screening for pediocin AcH resistance ». *Applied and Environmental Microbiology* 71.3, pages 1283–1290.
- YAMAZAKI, Koji, Minako SUZUKI, Yuji KAWAI, Norio INOUE et Thomas J. MONTVILLE (2005). « Purification and Characterization of a Novel Class IIa Bacteriocin, Piscicocin CS526, from Surimi-Associated *Carnobacterium piscicola* CS526 ». *Applied and Environmental Microbiology* 71.1, pages 554–557.

- YANG, R, M C JOHNSON et B RAY (1992). « Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria ». *Applied and environmental microbiology* 58.10, pages 3355–3359.
- YAO, Y., Y. ZHOU et C. WANG (1997). « Both the isomerase and chaperone activities of protein disulfide isomerase are required for the reactivation of reduced and denatured acidic phospholipase A2 ». *The EMBO journal* 16.3, pages 651–658.
- YILDIRIM, Selcuk, Daniel KONRAD, Ségolène CALVEZ, Djamel DRIDER, Hervé PRÉVOST et Christophe LACROIX (2007). « Production of recombinant bacteriocin divercin V41 by high cell density *Escherichia coli* batch and fed-batch cultures ». *Applied microbiology and biotechnology* 77.3, pages 525–531.

Titre : Amélioration de la production hétérologue de la bactériocine pédiocine chez *Lactococcus lactis*

Résumé :

Un des enjeux majeurs en génie microbien est de produire des quantités élevées de protéines à l'état natif. Parmi les hôtes disponibles pour la production hétérologue de protéines, *Lactococcus lactis* est une bactérie à fort potentiel. Son innocuité et son caractère gram positif en fait un hôte de choix pour la production de protéines d'intérêt au niveau extracellulaire. Parmi ces protéines figurent des bactériocines produites par des bactéries, lesquelles sont des protéines antibactériennes pouvant être utilisées à des fins de sécurité sanitaires des aliments voire comme antibiotique en thérapie anti-infectieuse. Ces travaux de thèse ont pour ambition d'améliorer la production hétérologue de la bactériocine modèle pédiocine chez *L. lactis* au niveau quantitatif et qualitatif en ciblant respectivement les étapes de sécrétion et de maturation post-traductionnelle. La sécrétion a été améliorée en insérant les séquences codant les pro-peptides SD ou LEISSTCDA entre la séquence codant le peptide signal de sécrétion et la séquence codant la bactériocine. Il a été montré que de telles insertions n'affectent pas son activité antibactérienne. L'analyse *in silico* de l'opéron responsable de la production de pédiocine chez la bactérie productrice sauvage a révélé que le gène *pedC* code une protéine prédite comme thiol-disulfide oxydoréductase, suggérant un rôle de cette protéine dans le statut redox des cystéines de la pédiocine. La co-expression de PedC avec la pédiocine recombinante a permis d'augmenter significativement le pouvoir antibactérien de la bactériocine co-produite. Les résultats obtenus pendant cette thèse ont ainsi montré que la production globale de pédiocine par *L. lactis* peut être améliorée par fonctionnalisation de l'extrémité N-terminale sans effet significatif sur le potentiel antibactérien de cette dernière et que PedC joue un rôle majeur dans le potentiel antibactérien de la pédiocine.

Mots clés : Génie microbien, Production hétérologue, *Lactococcus lactis*, Pédiocine PA-1, Bactériocine, Thiol-disulfide oxydoréductase

Title : Improving the heterologous production of the bacteriocin pediocin in *Lactococcus lactis*

Abstract:

Lactococcus lactis is considered an efficient cell factory for recombinant protein production. It is able to produce and secrete class IIa bacteriocins such as pediocin PA-1 via the general secretion (Sec) pathway. However, the positive charges at the N-terminus of pediocin PA-1 might impair secretion *via* the Sec secretion pathway and the obtained recombinant pediocin has been described as less potent than the pediocin from the natural producer. The impact of two propeptides on the production yield and on the potency of recombinant pediocins was investigated. The nucleotide sequences encoding the propeptides SD or LEISSTCDA were inserted between the sequence encoding the signal peptide of Usp45 and the structural gene of the mature pediocin PA-1. Both propeptides improved secretion of the recombinant pediocins. Although no major impact on the antibacterial activity of recombinant pediocins was observed, all recombinant bacteriocins produced in *L. lactis* were less potent than wildtype pediocin. Co-expression of the putative thiol-disulfide oxidoreductase PedC, which is encoded by the pediocin PA-1 operon, with the recombinant pediocins allowed to significantly decrease the minimal inhibitory concentration of the produced bacteriocins. To our knowledge, this report shows for the first time that the propeptides SD or LEISSTCDA lead to an improved secretion of recombinant pediocins with apparently no effect on the antibacterial potency and that PedC plays a major role in the potency of pediocin.

Keywords: Microbial engineering, Heterologous expression, *Lactococcus lactis*, Pediocin PA-1, Bacteriocin, Thiol-disulfide oxidoreductase