

ALAIN I. BOULENDE SABOUBANGA

ÉTUDE DE MUTACINES

Mémoire présenté

à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval

dans le cadre du programme de maîtrise en Microbiologie-immunologie

pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

DÉPARTEMENT D'ANATOMIE PHYSIOLOGIE
FACULTE DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

MARS 2007

RÉSUMÉ

Le phénomène croissant d'acquisition de résistances aux antibiotiques par les bactéries demeure une des préoccupations majeures de santé publique. Notre laboratoire s'investit dans le développement de nouveaux moyens envisagés pour freiner cette résistance, par l'étude des mutacines. Ces mutacines sont des peptides antimicrobiens de la famille des bactériocines démontrant une activité inhibitrice sur un certain nombre de bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques conventionnels.

Les objectifs de ma maîtrise étaient de produire en milieu liquide, purifier et caractériser les mutacines D-123.1, P-136.1 et U-F respectivement produites par trois souches différentes de *Streptococcus mutans* : 123.1, 136.1 et F.

Ainsi, après plusieurs tentatives de production, seule la mutacine D-123.1 issue d'un milieu de perméat de lactosérum enrichi à l'extrait de levure a montré une légère activité. Ce surnageant actif s'est montré sensible à 70°C/ 15min, mais résistant à 50°C/ 15 min. Elle est active à pH 4,5. Les essais de purification par chromatographies hydrophobes et d'échanges d'ions n'ont pas permis la purification de la mutacine D-123.1.

Abstract

The increasing bacterial antibiotic resistance is of major concern in public health. In our laboratory we search for new natural antimicrobial substances to replace antibiotics to which bacteria are becoming more and more resistant. Mutacins are antimicrobial substances of the bacteriocin family showing inhibitory activity against antibiotic-resistant pathogenic bacteria.

The objectives of my research were to produce in liquid medium, to purify and characterize mutacins D-123.1, P-136.1, and U-F. These mutacins are respectively produced by strains of *Streptococcus mutans* 123.1, 136.1, and F.

After several attempts of production, only mutacin D-123.1 was detected in liquid medium made of cheese whey permeate enriched with yeast extract. The activity was thermosensitive (70°C/15 min) but resisted a treatment at 50°C/15 min. It is active at pH 4.5. Attempts at purification of mutacin D123.1 using hydrophobic and ion exchange chromatographies did not succeed.

REMERCIEMENTS

Je remercie sincèrement le Dr Marc Lavoie qui m'a offert la chance de réaliser ce projet au sein de son laboratoire et pour avoir dirigé mes travaux.

Merci à mon co-directeur Philippe Tessier et son équipe qui m'a soutenu et a facilité une partie de mes recherches dans son laboratoire du CHUL à une période cruciale de mon projet. Je ne saurais oublier le Dr Sylvain Bourgoïn, directeur du programme de microbiologie-immunologie de la Faculté de médecine (Université Laval), dont je salue la disponibilité, merci pour tes précieux conseils.

Mes remerciements s'adressent aussi à tous les professeurs, techniciens et au personnel du Département de biochimie et de microbiologie de la Faculté des Sciences et Génie, pour leur accueil et leur assistance permanente (André Darveau, Marc Desrochers, Louis-André Lortie, Luc Trudel, Laurent Smith, Agathe, Guy, Robert, Marie, Francine...).

« La palme d'or » de mes remerciements est pour toi, Guillaume Nicolas, travailleur inlassable et inspiré, compagnon fidèle avec qui j'ai « remué » et « partagé les mutacines » au quotidien. Ce travail est aussi le tien.

Je remercie la communauté gabonaise de Québec pour sa présence, plus encore pour ceux qui m'entourent chaleureusement (Michel, Mahiné, David, Célestine, mon cousin Réal, Angéla, Jeff alias « chou la fleur », titi. b, maman Tiphaine, Diaz popovych, Karl, Eto'o dit Bob Guéné, mon neveu Glein Akwembi, Fany).

Une fois n'est pas coutume, je voudrais honorer l'État gabonais, par l'entremise de la Direction Générale des Bourses et Stages (DGBS) qui par son soutien financier a permis la concrétisation de ma maîtrise et qui continue d'appuyer les projets de plusieurs étudiants du Gabon.

DÉDICACES

JE DÉDIE CE MÉMOIRE :

L'Éternel Dieu pour sa bienveillance, ce travail a été possible grâce à ta volonté.

Mon papa, j'espère que de là ou tu es désormais, tu apprécieras cette nouvelle étape que je franchis, tu as été le grand initiateur de mon projet d'études.

Ma maman, pour son amour, son soutien spirituel, notre complicité m'est vitale.

Ma grande sœur Nadège, grande artisane, tu me soutiens depuis mes débuts à l'école primaire et c'est encore grâce à toi que j'ai pu étudier au Canada.

Lewise Nathalie, ma compagne, ma source d'inspiration, tu resteras « l'utile et l'agréable dans ma vie ».

Ma famille, mes adorables neveux, je vous dois tout, joie, affection, espoir. Vous êtes ma source de motivation, la clé de mon épanouissement et de ma réussite.

Tous mes amis d'enfance et compagnons de tous les instants (Arno.b, Stecy, Coleman, Armel et Mwetse, Bernard, Blaise, KGB, Kriseau, Mergel, Keman, Dégyryse, Dexter, Valdo, Mino...).

AVANT-PROPOS

Mes travaux s'inscrivent dans la suite des recherches effectuées par Guillaume Nicolas (Nicolas G. et al, 2004) qui recommandent le criblage de toutes les méthodes de production et de détection pouvant aboutir à une optimisation de la production de mutacines en milieu liquide en vue d'obtenir un meilleur rendement.

L'introduction générale situe la problématique, les hypothèses de recherche ainsi que sur les objectifs de notre démarche. La revue de littérature met un accent sur toutes les bactériocines produites par *Streptococcus mutans*, leur mode d'action et leur classification. Elle nous dévoile également les enjeux et le potentiel d'application immense que l'on pourrait tirer de ces peptides antimicrobiens.

Le deuxième chapitre résume les différentes techniques utilisées au cours de ma maîtrise, et le troisième consigne les résultats obtenus. L'avant-dernier chapitre tentera d'interpréter les résultats, d'expliquer les insuffisances comparativement aux travaux sur les bactériocines décrites dans la littérature. Enfin, le dernier chapitre contient la conclusion et les perspectives.

« La recherche scientifique fait partie de la vie quotidienne, mais elles sont différentes en ce sens que le recommencement est toujours possible en science alors que le recommencement d'une vie connaîtra toujours une limite ». Prosper Mérimée, Les maximes de la science.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	II
ABSTRACT.....	III
REMERCIEMENTS.....	IV
DÉDICACES.....	V
AVANT-PROPOS.....	VI
TABLE DES MATIÈRES.....	VIII
LISTE DES TABLEAUX.....	XIII
LISTE DES FIGURES.....	XIV

CHAPITRE I

INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
PROBLÉMATIQUE.....	2
BUT ET OBJECTIF DU PROJET.....	3
REVUE DE LITTÉRATURE.....	5
1.1. LES PEPTIDES ANTIMICROBIENS.....	5
1.2. LES BACTÉRIOCINES : DÉFINITIONS.....	6
1.2.1. PROPRIÉTÉS CHIMIQUES ET CLASSIFICATION DES BACTÉRIOCINES...8	
1.2.2. GÉNÉTIQUE ET BIOSYNTHÈSE DES BACTÉRIOCINES.....11	
1.2.2.1. ORGANISATION ET FONCTION DES GÈNES.....11	
1.2.2.2. BIOSYNTHÈSE DES BACTÉRIOCINES.....11	
1.2.2.3. MODE D'ACTION.....12	
1.2.3. PURIFICATION DES BACTÉRIOCINES.....15	
1.3. LES APPLICATIONS DES BACTÉRIOCINES.....	17
1.3.1 LES UTILISATIONS CONNUES.....17	

1.3.2. PERSPECTIVES D'UTILISATION.....	18
1.3.3. RÉSISTANCE AUX BACTÉRIOCINES.....	19
1.4. STREPTOCOCCUS MUTANS.....	23
1.5. LES MUTACINES.....	25
1.5.1. CLASSIFICATION DES MUTACINES.....	25
1.5.2. MODE D'ACTION.....	28
1.5.3. LES MUTACINES DE <i>S. MUTANS</i> CARACTÉRISÉES.....	29
1.5.4. LES AUTRES MUTACINES PRODUITES PAR <i>S. MUTANS</i>	37
1.5.5. PERSPECTIVES D'APPLICATION DES MUTACINES.....	44
1.6. OPTIMISATION DE LA PRODUCTION DES BACTÉRIOCINES.....	46
1.6.1. INFLUENCE DES FACTEURS INTRINSÈQUES.....	47
1.6.2. INFLUENCE DES FACTEURS EXTRINSÈQUES.....	47
1.6.2.1. MILIEU DE CULTURE.....	48
1.6.2.2. RÔLE DES SOURCES D'AZOTE.....	48
1.6.2.3. RÔLE DES IONS ET DES SURFACTANTS.....	49
1.6.3. LES CONDITIONS DE CULTURE.....	50
1.6.3.1. DURÉE D'INCUBATION.....	50
1.6.3.2. EFFET DE L'AGITATION.....	50
1.6.3.3. INFLUENCE DU PH ET DE LA TEMPÉRATURE.....	50
1.6.3.4. CONDITIONS AÉROBIES VS ANAÉROBIES.....	51

CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. SOUCHES BACTÉRIENNES.....	53
2.2. MILIEUX ET CONDITIONS DE CULTURE.....	55
2.3. PRODUCTION ET DÉTECTION DES MUTACINES EN MILIEU LIQUIDE.....	56
TAPIS DE <i>M. LUTEUS</i>	57
MÉTHODE DES DILUTIONS CRITIQUES.....	57
2.3.1. DÉTECTION DES MUTACINES PAR RÉDUCTION DU CHLORURE DE TRIPHÉNYL TÉTRAZOLIUM (TTC).....	59
2.3.1.1. PRÉPARATION DU TTC.....	59

2.3.2. INDUCTION DE LA PRODUCTION DE MUTACINE PAR CO-CULTURE.....	61
2.3.2.1. CO-CULTURE AVEC DES SOUCHES DE <i>S. MUTANS</i> , <i>M. LUTEUS</i> , ET D'AUTRES STREPTOCOQUES ORAUX.....	61
2.3.2.2. INDUCTION DE LA PRODUCTION DE MUTACINE PAR DES SURNAGEANTS ACTIFS.....	61
2.3.3. EFFET DU VOLUME D'INOCULUM SUR LA PRODUCTION DE MUTACINE.....	64
2.3.4. MÉTHODES DE PURIFICATION-CONCENTRATION.....	64
2.3.4.1. CONCENTRATION SUR RÉSINE.....	64
2.3.4.1.1. LA PHASE STATIONNAIRE.....	65
2.3.4.1.2. LA PHASE MOBILE.....	65
2.3.4.2. FILTRATION DE FRACTIONS SUR MEMBRANE.....	67
2.3.4.2.1. MEMBRANE CENTRICON YM-10.....	67
2.4. PRODUCTION ET DÉTECTION DES MUTACINES A PARTIR DE MILIEUX SOLIDES.....	68
TEST D'ANTAGONISME DIFFÉRÉ.....	68
2.4.1. INCORPORATION DE BILLES DE VERRE ET DE SILICE DANS LES MILIEUX DE CULTURE.....	69
2.4.2. EXTRACTION DE L'ACTIVITÉ DES MUTACINES PAR DES SOLVANTS.....	69
2.4.2.1. EXTRACTION D'UN FLUIDE PAR GEL ET DÉGEL.....	69
2.4.2.2. EXTRACTION PAR L'ÉTHANOL.....	70
2.4.2.3. EXTRACTION AU CHLOROFORME.....	71
2.4.3. PRODUCTION DE MUTACINE PAR IMMOBILISATION DE CELLULES DANS DES BILLES D'ALGINATES.....	73
2.4.4. DÉTECTION DE MUTACINES PAR MIGRATION SUR GEL ÉLECTROPHORÉTIQUE.....	75
2.4.4.1. PRÉPARATION ET MIGRATION DU GEL OVERLAY.....	75
2.4.4.2. TEST D'ACTIVITÉ PAR SUPERPOSITION DU GEL DE POLYACRYLAMIDE.....	75

2.4.5. MÉTHODE LACUNA ASSAY.....	78
2.4.6. EXTRACTION DE L'ACTIVITÉ DES MUTACINES SUR GEL D'AGAROSE LOW MELT.....	80

CHAPITRE III : RÉSULTATS

3.1. OPTIMISATION DE LA PRODUCTION DES MUTACINES.....	82
3.1.1. RÔLE DES SOURCES DE CARBONE.....	82
3.1.2. RÔLE DES IONS ET DU SURFACTANT.....	82
3.1.3. CONDITIONS DE CULTURE.....	83
3.2. DÉTECTION DES MUTACINES PAR RÉDUCTION DU TTC.....	84
3.3. PRODUCTION DE MUTACINE PAR CO-CULTURE.....	86
3.4. EFFET DES BILLES SOLIDES SUR LA PRODUCTION DES MUTACINES.....	86
3.5. EXTRACTION DES MUTACINES PAR LES SOLVANTS.....	87
3.6. IMMOBILISATION DES CELLULES DANS DES BILLES D'ALGINATE.....	87
3.7. DÉTECTION DE MUTACINE SUR GEL « OVERLAY ».....	87
3.8. INFLUENCE DU VOLUME D'INOCULUM SUR LA PRODUCTION.....	88
3.9. MÉTHODE « LACUNA ASSAY ».....	90
3.10. EXTRACTION DE L'ACTIVITÉ SUR GEL D'AGAROSE LOW MELT... 	91

CHAPITRE IV : DISCUSSION

4.1. PRODUCTION ET DÉTECTION DES MUTACINES EN MILIEU LIQUIDE.....	94
4.1.1. DÉTECTION PAR RÉDUCTION DU TTC.....	94

4.1.2. INDUCTION DE LA PRODUCTION PAR CO-CULTURE.....	95
4.1.3. EFFET DU VOLUME D'INOCULUM SUR LA PRODUCTION.....	96
4.1.4. MÉTHODE DE PURIFICATION-CONCENTRATION.....	98
4.2. PRODUCTION ET DÉTECTION DES MUTACINES Á PARTIR DE MILIEU SOLIDE.....	99
4.2.1. EFFET DES BILLES SOLIDES SUR LA PRODUCTION DES MUTACINES.....	99
4.2.2. EXTRACTION DES MUTACINES PAR DES SOLVANTS.....	100
4.2.3. PRODUCTION PAR IMMOBILISATION DE CELLULES DANS DES BILLES D'ALGINATE.....	101
4.2.4. DÉTECTION DE MUTACINE PAR MIGRATION SUR GEL OVERLAY.....	102
4.2.5. MÉTHODE LACUNA ASSAY.....	103
4.2.6. EXTRACTION DE L'ACTIVITÉ SUR AGAROSE LOW MELT.....	104
 CHAPITRE V	
5.1. CONCLUSION GÉNÉRALE.....	106
5.2. PERSPECTIVES ET AVENIR.....	107
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	109

Liste des tableaux

TABLEAU 1.1. CLASSIFICATION DES BACTÉRIOCINES DES BACTÉRIES LACTIQUES.....	10
TABLEAU 1.2. SÉQUENCE N-TERMINALE DES MUTACINES CARACTÉRISÉES.....	43
TABLEAU 2.1. SOUCHES BACTÉRIENNES UTILISÉES.....	54
TABLEAU 2.2. RÉSINES ET TAMPONS UTILISÉS POUR LA CONCENTRATION.....	66
TABLEAU 3.1. MESURE DE LA DENSITÉ OPTIQUE LORS DE LA RÉDUCTION DU CHLORURE DE TRIPHÉNYL TÉTRAZOLIUM	85
TABLEAU 3.2. RÉSULTATS DE L'EFFET DU VOLUME D'INOCULUM SUR LA PRODUCTION DE MUTACINE.....	89
TABLEAU 3.3. RÉSULTATS TEST LACUNA AVEC <i>S. MUTANS</i> 123.1.....	92

Liste des figures

FIGURE 2.1. SCHÉMA DE BIOSYNTHÈSE D'UNE BACTÉRIOCINE.....	14
FIGURE 2.1. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE DE TITRATION.....	58
FIGURE 2.2. RÉDUCTION DU CHLORURE DE TRIPHÉNYL TÉTRAZOLIUM.....	60
FIGURE 2.3. INDUCTION DE LA PRODUCTION DE MUTACINE PAR CO-CULTURE.....	62
FIGURE 2.4. INDUCTION DE LA PRODUCTION DE MUTACINE PAR LES SURNAGEANTS ACTIFS.....	63
FIGURE 2.5. ÉTAPES DE L'EXTRACTION AU CHLOROFORME.....	72
FIGURE 2.6. PRODUCTION DE MUTACINE DANS DES BILLES D'ALGINATE.....	74
FIGURE 2.7. MÉTHODE DE MIGRATION SUR GEL OVERLAY.....	77
FIGURE 2.8. MÉTHODE LACUNA ASSAY AVEC <i>S. MUTANS</i> 123.1.....	79

LISTE DES ABRÉVIATIONS

MILIEUX DE CULTURE :

TSBYE: Trypticase Soy Broth-Yeast Extract (extrait trypsique de soja et extrait de levure)

SWP: Perméat de lactosérum + Extrait de levure+ CaCO₃

MRS: Man-Rogosa Sharp

BHI: Brain Heart Infusion (Infusion de coeur et de cervelle)

THB: Todd Hewitt Broth

M17: Milieu complexe à base d'extrait de viande, de peptone et d'extrait de levure.

UNITÉS:

kDa: Kilo Dalton

UA/ml: Unité Arbitraire par millilitre

AUTRES:

rpm: rotation par minute

CHAPITRE I

INTRODUCTION GÉNÉRALE

PROBLÉMATIQUE

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

Afin d'éradiquer cette résistance sans cesse croissante, il devient impérativement urgent de développer de nouvelles classes de composés antimicrobiens. À cet égard, l'utilisation des peptides antimicrobiens est préconisée à cause de leur capacité à contenir l'apparition de résistance au sein des souches bactériennes impliquées (Hancock, 1997; Hancock et al. 1999; Papagiani, 2003; Yeaman et Yount, 2003).

De par leur nature, leur variété et leurs différents mécanismes d'actions, les peptides antimicrobiens représentent une alternative intéressante parmi les nouvelles stratégies de contrôle de la multirésistance bactérienne aux antibiotiques (Twomey et al. 2002; Papagiani, 2003; Nascimento et al. 2005, Trautner et al. 2005).

BUT ET OBJECTIF DU PROJET

Une des solutions proposées pour réduire à long terme l'utilisation des antibiotiques pour le traitement des maladies infectieuses tant chez l'humain que chez l'animal, fait appel à la capacité de certaines bactéries à produire des peptides antibactériens appelés bactériocines.

La nisine, seule bactériocine autorisée par la FDA (Food and Drug Administration, 1988) comme additif alimentaire, a été utilisée avec succès pour inhiber la croissance de *Clostridium* et de *Listeria* dans les fromages à base de lait pasteurisé et les produits carnés (Hirsch et al. 1951, Guiré et al. 1995). Cependant, l'apparition récente de souches résistantes à la nisine (Goulhen et al. 1998, Ennahar et al. 2000) oblige l'intensification des recherches sur d'autres bactériocines.

Dans notre laboratoire, vingt-quatre types de mutacine (bactériocines de *Streptococcus mutans*) identifiés (Morency et al. 1995) présentent le profil idéal pour lutter contre les pathogènes bactériens multirésistants aux antibiotiques conventionnels (Mota-Meira et al. 2000, Morency et al. 2001).

Le but de cette étude est donc de produire et caractériser trois nouvelles mutacines dont le spectre d'activité inclue les souches résistantes à la nisine (Morency et al. 2001).

En dépit du potentiel considérable qu'offrent ces mutacines contre les pathogènes bactériens, très peu de ces peptides ont été identifiés à l'heure actuelle. En effet, l'isolement de bactériocines en général et de mutacines en particulier se heurte à certains écueils, notamment une production difficile et insuffisante en milieu liquide de même qu'une détection pas toujours facile (Parrot et al. 1989; Caufield et He, 2004; Nicolas et al. 2004).

À ce titre, les objectifs de recherche ont été les suivants :

- Produire les mutacines D-123.1, P-136.1 et U-F en milieu liquide tout en déployant les moyens permettant d'optimiser leur production et leur détection.
- Purifier ces trois mutacines idéalement par chromatographie.
- Établir le spectre d'activité des mutacines pures contre différentes espèces bactériennes disponibles au laboratoire.
- Déterminer leurs propriétés physico-chimiques (Poids moléculaire, thermosensibilité, sensibilité à différentes enzymes, activité à différents pH).

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1. LES PEPTIDES ANTIMICROBIENS

Face aux nouvelles bactéries émergentes et aux phénomènes de résistance des bactéries aux antibiotiques classiques, les peptides antimicrobiens pourraient constituer une alternative aux traitements antibiotiques traditionnels.

Composants essentiels du système immunitaire inné (Boman, 1995), les peptides antimicrobiens, petites molécules endogènes, polycationiques et ubiquitaires, constituent la première ligne de défense des organismes vivants contre les invasions microbiennes.

On les retrouve généralement chez :

- les bactéries (bactériocines) où ils pourraient jouer un rôle dans la colonisation et/ou la défense d'une niche écologique;
- les invertébrés comme la drosophile pour qui ils constituent le principal système de défense de l'organisme;
- et les vertébrés en particulier les mammifères où ils renforcent ou substituent le système immunitaire.

Ces peptides naturels bioactifs ont un effet à large spectre à la fois contre des bactéries, des champignons et des virus possédant une enveloppe (Ross et al. 1999). Ils sont

soit synthétisés par les ribosomes soit d'origine non ribosomique formé par un complexe enzymatique (Hancock et al. 1997; Jack et Jung, 1998).

Leur structure varie en fonction de la simplicité ou de la complexité des acides aminés constituant le peptide. Cette diversité structurelle expliquerait les différents mécanismes d'action des peptides antimicrobiens sur les cellules cibles.

1.2. LES BACTÉRIOCINES : DÉFINITIONS

L'effet inhibiteur justifiant l'intérêt pour les bactériocines a été observé par Pasteur et Joubert (1877) et cité par Tagg et al. (1976). Une étude approfondie menée par Gratia en 1925, permet d'isoler d'*Escherichia coli* V une substance bactéricide envers une souche de *E. coli* Ø; elle fut appelée « principe V » (Reeves, 1965). En 1946, Gratia et Frédéricq substitua à cette appellation, le terme plus précis de « colicine ».

C'est en 1944 que la diplococcine, première bactériocine d'origine lactique fut identifiée (Oxford, 1944). Hirsch et al. (1951) démontrèrent qu'une bactériocine nommée nisine inhibait le développement de *Clostridium* au cours de l'affinage de fromage. C'est à partir de cette date que l'usage de bactériocine est préconisé dans la préservation des aliments.

De ce fait, le terme bactériocine fut généralement employé pour désigner des peptides inhibiteurs de nature protéique et du type colicine sécrétés par un certain nombre d'espèces bactériennes (Jacob et al. 1953). On distingue les bactériocines produites par les bactéries à Gram positifs, petits peptides de taille inférieure à 10 kDa, des bactériocines

issues de bactéries à Gram négatif comme *E. coli* et plus connue sous le nom de colicine. Leur poids moléculaire est supérieur à 20 kDa et leur spectre est plus restreint aux souches apparentées à la souche productrice. Par contraste les bactériocines produites par des bactéries à Gram positif ont un spectre généralement plus étendu (Hamon et Peron, 1963).

Les bactériocines sont donc définies comme étant des peptides antimicrobiens synthétisés par une bactérie et qui démontrent une activité inhibitrice contre des bactéries apparentées à la souche productrice (Tagg et al. 1976; Klaenhammer, 1988; Jack et al. 1995). Leur spectre d'activité peut s'étendre à certaines bactéries à Gram négatif surtout lorsqu'elles sont associées à un chélateur de type EDTA (Vessoni Penna et al. 2006; Lyon et Glatz, 1991). Les gènes des bactériocines sont soit encodés sur un chromosome, comme c'est le cas chez *Lactococcus lactis* (Liu et Hansen, 1990) et les streptocoques du groupe A (Simpson et Tagg, 1984), soit portés par un plasmide (Heng et al. 2006, Abriouel et al. 2006; Nettles et Barefoot., 1993; Garriga et al. 1993).

Certaines bactériocines ont montré une activité inhibitrice sur les bactéries sécrétrices (Hamon, 1965), mais dans la majorité des cas les souches productrices sont insensibles à leur propre bactériocine jusqu'à un certain degré, comparativement aux souches non productrices. Cette autoprotection spécifique à chaque espèce, n'est pas due à une incapacité d'adsorption de la bactériocine (Nomura, 1967; Maeda et Nomura, 1966; Reeves, 1965; Hamon, 1965), elle est plutôt liée à la synthèse d'une protéine d'immunité par la souche productrice (Siegers et Entian, 1995; Klein et Entian, 1994; Engelke et al.

1994, Kuipers et al. 1993, Nissen-Meyer et al. 1992). L'immunité d'une souche productrice face à sa bactériocine n'est donc pas automatique contre toutes les autres bactériocines.

1.2.1. Propriétés chimiques et classification

Les bactériocines sont des peptides cationiques et hydrophobes; ils sont sensibles aux protéases et la majorité présente une activité maximale à pH acide (Ennahar et al. 2000). Leur activité est détectable à faible dose. La composition chimique des bactériocines est très hétérogène. On peut y retrouver des protéines simples (Kanatani et al. 1995, Valdés-Stauber et al. 1994, Novák et al. 1994, Rodriguez et al. 1992), des complexes de protéines couplées à des hydrates de carbone (Schved et al. 1993; Lewus et Montville, 1992; Fikes et al. 1983) ou à un complexe hydrate de carbone-lipide (Upreti et Hinsdill., 1975; Barry et al. 1963). Les bactériocines produites par les bactéries à Gram positif sont généralement plus résistantes que celles des bactéries à Gram négatif. Elles sont à quelques exceptions près thermostables à 100°C pendant 1 h (Mathieu et al. 1993a, Parrot et al. 1990; Barefoot et Klaenhammer, 1983, 1984) et même à 121°C pendant 15 à 30 minutes (Parrot et al. 1990; Dempster et Tagg., 1982). Plusieurs bactériocines sont beaucoup plus stables et actives aux pH acides, excepté la mutacine RM-10 qui est plus stable aux pH alcalins (Fukushima et al. 1982).

Les bactériocines de par leur origine, leur diversité structurale et leurs différents modes d'action constituent un groupe très diversifié de protéines dont l'identification nécessite une classification appropriée. Plusieurs modèles de classification ont été

proposés. Une première classification des bactériocines produites par les bactéries lactiques fut proposée par Klaenhammer (1988) et mise à jour (1993). Elle répartissait les bactériocines des LAB (Lactic Acid Bacteria) en quatre classes distinctes en se basant sur leur taille, leur structure et leur mode d'action.

La classification actuelle, la plus acceptée, repose essentiellement sur celle des bactériocines issues des bactéries lactiques (Barefoot et al. 2000) dont une cinquantaine de représentants sont connus jusqu'à ce jour (Lüders et al. 2003). Cette classification est basée sur le poids moléculaire des bactériocines ainsi que sur leur stabilité à la chaleur (Tableau 1.1) (Klaenhammer, 1993; de Vos et al. 1995, Nes et al. 1996, Barefoot et al. 2000, Cintas et al. 2001; Heng et Tagg, 2006). Ainsi dans la classe I par exemple, sont essentiellement regroupés les bactériocines qui contiennent dans leur chaîne des acides aminés modifiés tels que les lanthionines et les β -méthyl lanthionines, c'est le cas de la nisine. Par contre, la classe IV contient les bactériocines cycliques, la circularisation résulte du fait de la liaison peptidique qui s'établit entre les extrémités C et N-terminal de la même molécule.

Tableau 1.1. Classification des bactériocines des bactéries lactiques

Classes	Sous-classes
Classe I-Lantibiotiques	Contiennent des lanthionines et des β -méthyl lanthionine <u>Ia</u> : molécules linéaires <u>Ib</u> : bactériocines globulaires <u>Ic</u> : bactériocines composées de plusieurs peptides
Classe II- Peptides non modifiés	<u>IIa</u> : bactériocines apparentées à la pédiocine <u>IIb</u> : peptides de type divers <u>IIc</u> : bactériocines composées de plusieurs peptides
Classe III- Protéines de poids moléculaire élevé	<u>IIIa</u> : bactériocines bactériolytiques <u>IIIb</u> : peptides non lytiques
Classe IV	peptides cycliques

Classification proposée récemment par Heng et Tagg, 2006.

1.2.2. Génétique et biosynthèse des bactériocines

1.2.2.1. Organisation et fonction des gènes

Les gènes associés à la biosynthèse sont de façon générale, regroupés en opéron. On retrouve certains de ces opérons associés à des transposons, comme dans le cas de la nisine (Dodd et al. 1991). Les opérons codant pour la synthèse de bactériocines peuvent être localisés sur un plasmide mais il arrive qu'ils se retrouvent sur le chromosome, comme pour l'helvéticine J (Joerger et Klaenhammer, 1986, 1990). Les gènes codant pour la biosynthèse de la nisine sont soit plasmidiques, soit à la fois plasmidiques et chromosomiques (Steen, 1991). Ces gènes peuvent également être intégrés sur un chromosome à partir d'un plasmide, par l'intermédiaire de transposons (Dodd et al. 1991, Dodd et al. 1990).

1.2.2.2. Biosynthèse des bactériocines

La biosynthèse d'une bactériocine nécessite l'action d'une multitude de gènes dont les produits peuvent interagir selon des mécanismes complexes très peu connus. Ces gènes codent pour des protéines d'induction, de structure, de modification (dans le cas des antibiotiques), de transport, de clivage et d'immunité. Dans le cas de la nisine, la biosynthèse est initiée par l'émission d'un signal provoqué par un facteur d'induction. La protéine membranaire, souvent une histidine kinase (Figure 1.1) effectue la phosphorylation lors de la reconnaissance du peptide inducteur qui interagit avec les promoteurs situés sur l'opéron de la bactériocine. Il a également été démontré que les

biosynthèses de la nisine et de la carnobactériocine B2 sont induites par la bactériocine elle-même (Quadri et al. 1997, Kuipers et al. 1995) tandis que chez les bactériocines de classe II, la biosynthèse est induite suite au clivage d'un peptide leader inactif et similaire à la bactériocine (Nes et al. 1996a, Kuipers et al., 1995). Toutefois, le facteur d'induction de la plantaricine a démontré une activité bactéricide (Anderssen et al. 1998).

Le transport des bactériocines à l'extérieur de la cellule est assuré selon deux mécanismes distincts. Des transporteurs de type ABC (« ATP-binding cassette ») identifiés chez *Streptococcus mutans* 286 et 287 sont préférentiellement utilisés lors de la biosynthèse des mutacines nonantibiotiques (Tagg et al. 2005, Nes et al. 1995; Wandersman, 1998).

Toutefois, un nombre restreint de bactériocines à l'exemple de l'acidicine B (Leer et al. 1995) et de l'enterocine P (Herranz et Driessen, 2005) sont secrétées via la voie sec-dépendante.

À la suite de la sécrétion des bactériocines matures, l'immunité est conférée à la souche productrice grâce à des protéines d'immunité dont le mécanisme d'action exact reste peu connu.

1.2.2.3. Mode d'action

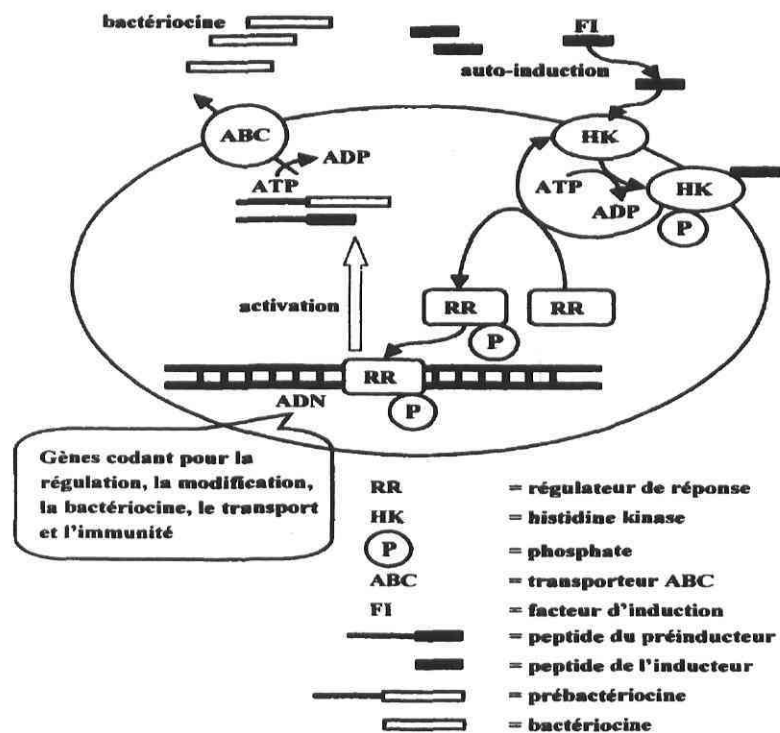
L'activité inhibitrice des bactériocines se manifeste essentiellement par une interaction avec les lipides anioniques constituant les membranes bactériennes (Héchar et Sahl, 2002). Elle aboutit dans la majorité des cas à la formation de pores dans la membrane cytoplasmique des cellules cibles, à la chute du potentiel de membrane menant à la perte de leur force proton motrice, à une rupture du métabolisme énergétique (exemple de la

colicine E1) et à l'arrêt de la synthèse de macromolécules conduisant à la mort des cellules cibles. La colicine E3 inhibe la synthèse des protéines alors que la colicine E2 inhibe la synthèse de l'ADN.

L'action des bactériocines sur les cellules cibles peut également entraîner des effets bactériostatiques et sporostatiques (González et al. 1994, Daba et al. 1991, Tagg et al. 1976).

En général, l'action des bactériocines sur les cellules cibles se déroule en trois phases selon la classe et la nature des peptides. Il est observé chez certaines bactériocines une fixation préalable à des récepteurs spécifiques. D'autres bactériocines tels que les lantibiotiques de type A utilisent le lipide II comme une molécule d'ancrage pour leur fixation aux membranes et pour l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane (Bauer et Dicks, 2005; Wiedemann et al. 2001, Breukink et al. 1999). Bien que la présence de récepteurs spécifiques soit indispensable à l'action d'un grand nombre de bactériocines, il n'en demeure pas moins que certaines d'entre elles comme la nisine, peuvent directement traverser les membranes sans se fixer sur des récepteurs cellulaires (Gao et Konings, 1991; Kordel et Sahl, 1986). L'insertion des bactériocines à travers la membrane cellulaire est la deuxième phase; elle est immédiatement suivie par la modification des fonctions biochimiques vitales qui entraînent la mort de la cellule cible (Baty et al. 1990).

Figure 1.1 : Mécanisme d'induction de l'expression des gènes et de la biosynthèse de bactériocines (adapté de Nissen-Meyer et al. 1997).



1.2.3. Purification des bactériocines

Les bactériocines forment un groupe hétérogène, et il est de ce fait difficile d'établir un protocole de purification qui convienne à chacune d'elle. La facilité d'agrégation des bactériocines avec d'autres molécules, l'hydrophobicité, leur production variable, ainsi que les variations de pH sont autant d'obstacles à une purification aisée. Ceci pourrait expliquer pourquoi jusqu'à présent une majorité de bactériocines n'a pas encore été purifiée (De Vuyst et Vandamme, 1994). Les propriétés cationiques et hydrophobes des bactériocines sont mises à profit pour leur récupération à partir de milieux de culture.

Mattick et Hirsch (1947), utilisèrent une combinaison de traitements acides et extractions aux solvants organiques suivis de précipitation en vue de purifier des bactériocines. L'étape préliminaire de précipitation au sulfate d'ammonium a été régulièrement utilisée ; cependant, les bactériocines ne sont pas totalement récupérées par cette méthode (Holo et al. 1996; Davey et Richardson, 1981). Il a également été démontré que le sulfate d'ammonium dissocie les bactériocines en sous-unités actives et modifie la conformation de la molécule, ce qui peut parfois provoquer une amplification anormale de l'activité biologique (Kashket, 1987). On lui préfère donc la chromatographie par échange d'ions (Uteng et al. 2002, Guyonnet et al. 2000).

L'utilisation de colonnes d'échange d'ions a servi avec succès à isoler la nisine (Bailey et Hurst, 1971), la diplococcine (Davey et Richardson, 1981), la leucocine A-UAL (Hasting et al. 1991) et la pédiocine PA-1 (Lozano et al. 1992).

Dans certains cas, les bactériocines peuvent être purifiées par une méthode de filtration sur gel, comme ce fut le cas pour la lactacine (Muriana et Klaenhammer, 1991) et la lacticine 481 (Piard et al. 1992). La chromatographie d'immunoaffinité basée sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux spécifiques contre les bactériocines a permis la purification de la nisine A et de la nisine Z en une seule étape (Suarez et al. 1997), mais sa mise en application à l'échelle industrielle serait difficile en raison des coûts énormes qu'elle nécessite.

Les propriétés d'adsorption et désorption des bactériocines sur les cellules en fonction du pH ont permis d'améliorer les procédés d'extraction de la nisine, la pédiocine Ach, la sakacine A et la leuconocine Lcm 1 (Yang et al. 1992), tout en conduisant à de rendements de production plus élevés. La chromatographie liquide haute performance en phase inversée (RP-HPLC) est l'étape finale de purification (Parente et Ricciardi, 1999). La HPLC et la RP-HPLC permettent d'obtenir des rendements de purification élevés pour certaines bactériocines -notamment la nisine (Mulders et al. 1991), la sakacine A (Holek et al. 1992), la mutacine B-Ny266 (Mota-Meira et al. 1997)- et des fractions concentrées plus actives.

Ces protocoles de purification, bien qu'excellents en laboratoire présentent des complexités qui limitent leur utilisation à plus grande échelle. C'est pour contourner ce souci que plusieurs études portant sur l'optimisation des conditions d'extraction des bactériocines ont été menées (Li et al. 2001; Burainek et Yousef, 2000). Ainsi, Burainek et Yousef (2000), sont parvenus à extraire la lacidine, une bactériocine produite par *Lactobacillus acidophilus* OSU133, avec du chloroforme; la récupération obtenue était

respectivement de 10 à 100 fois plus élevée comparativement à la précipitation au sulfate d'ammonium et à la méthode d'acidification des cellules. Li et al. (2001) ont développé une étude d'optimisation des conditions d'extraction de la nisine en utilisant un système à deux phases aqueuses (polyéthylène glycol/sel) qui a permis d'améliorer de 11,6 % le recouvrement de la nisine comparativement à la méthode standard d'extraction développée par Van't Hul et Gibbons (1996).

1.3. Les applications des bactériocines

1.3.1. Les utilisations connues

Depuis de longue date, les êtres humains sont naturellement exposés aux bactériocines par le biais de bactéries lactiques (grands producteurs de peptides antimicrobiens) incorporées au cours de la fermentation de plusieurs aliments dans lesquels elles inhibent la croissance de microorganismes pouvant contaminer ou altérer la qualité des aliments (Schillinger et al. 1996). La nisine, première bactériocine à être utilisée comme bioconservateur alimentaire, est reconnue comme substance GRAS (Generally Recognised As Safe) par la FDA (Food Drug Administration, USA) en 1988. Plus de cinquante pays (excepté le Canada) ont autorisé son utilisation qui recouvre plusieurs domaines tels que l'industrie laitière, la préparation des aliments pour bébé, la mise en conserve des aliments, la préparation du vin et des boissons alcoolisées comme la bière, la conservation des produits carnés, du poisson frais et des produits marins (Topisirovic et al.

2006, Urso et al. 2006, Ross et al. 1999, De Vuyst et Vandamme, 1994a; Delves-Broughton, 1990, 1996). Des études récentes ont montré que la nisine pourrait également inhiber des bactéries à Gram négatif devenues sensibles à la suite de stress physiques et chimiques (Kalchayanand et al. 1992, 1994; Stevens et al. 1991).

1.3.2. Perspectives d'utilisation

L'utilisation des bactériocines, et de la nisine en particulier comme bio-ingrédient naturel dans les aliments, en plus d'inhiber la majorité des pathogènes alimentaires comme *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* (Smith et al. 2003, Morency et al. 2001), *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* spp., et *Enterococcus faecalis* (Delves-Broughton, 1990 et 1996), a également l'avantage d'éliminer ou de réduire significativement le recours aux agents de conservation chimique (nitrites, dioxyde de soufre etc...) qui soulèvent des polémiques quant à leur nocivité sur les organismes humains ou animaux.

Malgré son potentiel inhibiteur confirmé, la nisine n'est toujours pas utilisée sur le plan clinique ni même en médecine vétérinaire à l'instar des antibiotiques conventionnels. Des études se poursuivent et recommandent son application comme antibiotique. En effet, la nisine pourrait être mise à contribution dans la lutte contre les ulcères d'estomac provoqués par *Helicobacter pylori* (Delves-Broughton et al. 1996) et contre les infections du colon causées par divers entérocoques et *Clostridium difficile* (Hancock et al. 1999). Ces succès incitent de nombreux groupes de recherche à rechercher de nouvelles souches productrices de bactériocines. Ainsi dans le domaine agro-alimentaire, de nombreuses

études préconisent l'usage de ces bioconservateurs soit directement dans l'aliment, soit par l'incorporation d'une souche productrice de bactériocine (exemple de bactéries probiotiques) (O'Sullivan et al. 2003; Ross et al., 1999). Lucas et al. (2006) sont parvenus à inhiber *Bacillus coagulans* dans des canettes de fruit et légume en y incorporant la souche productrice de l'enterocine AS-48.

Sur le plan clinique, d'autres bactériocines pourraient jouer un rôle clé en thérapie humaine dans la lutte contre les pathogènes multirésistants. C'est le cas de la mersacidine utilisé avec succès contre le staphylocoque doré résistant à la méthicilline, et de la lacticine 3147 contre les entérocoques résistants à la vancomycine (Galvin et al. 1999). Dans le même sens, les bactériocines présentent une alternative pour le contrôle et la prévention des infections nosocomiales. Nascimento et al. (2006) ont réussi à inhiber des souches de staphylocoque doré méthicilline résistant et coagulase négative avec l'aureocin A53 et l'épidermine. Dans le domaine cosmétique, l'épidermine, bactériocine produite par *Staphylococcus epidermidis* Tü 3298 est utilisée en remplacement de germicides chimiques courants pour lutter contre l'acné.

1.3.3. Résistance aux bactériocines

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

Dans le cas des bactériocines de classe IIa (type pédiocine), cette résistance naturelle affecte 1 à 8% des souches sauvages des bactéries testées (Larsen et Norrung, 1993; Ennahar et al. 2000) et se développe à des niveaux très élevés (Duffes et al. 2000) comparativement au mécanisme de résistance à la nisine qui évolue graduellement (Gravesen et al. 2001).

En effet, une activité de nisinase a été observée chez plusieurs *Bacillus* spp. (Jarvis et Farr, 1971). *Bacillus cereus* produit une nisinase bien caractérisée qui possède une activité déhydroalanine réductase qui dégrade la nisine (Jarvis et Farr, 1971). Dans certains cas, la résistance aux bactériocines peut être spontanée, elle résulte de l'accoutumance des bactéries à l'agent antimicrobien comme c'est le cas pour *Lactococcus lactis* IL 1403 envers la lacticine 3147 (Guinane et al. 2006). Cependant, les souches résistantes à ces différentes bactériocines se sont montrées sensibles aux mutacines (Morency et al. 2001, Mota-Meira et al. 2000) et jusqu'à date aucun mutant résistant aux mutacines n'a été rapporté (Smith et al. 2003; Dagry, 1996) d'où leur intérêt pour notre étude.

Le développement de la résistance bactérienne aux bactériocines est un phénomène complexe dont les mécanismes ne sont pas totalement caractérisés mais qui semble incriminer plusieurs éléments. La résistance bactérienne peut survenir à la suite des altérations de la composition de la membrane cytoplasmique, des modifications en phospholipides membranaires, et des changements de la paroi cellulaire (Fabretti et al. 2006, Russel et Montovani, 2001; Crandall et Montville, 1998). McEntire et al. (2004) ont montré que la résistance de *L. monocytogenes* à la nisine résulte d'une intense activité ATPase. D'autres études associent la résistance aux bactériocines à l'existence de plasmide.

Ainsi, Tang et al. (2001) ont identifié chez *L. lactis* subsp. *lactis* un gros plasmide PTS50 de 47 kb qui encode la résistance à la nisine. Chen et al. (2006) dans une étude similaire effectuée chez *L. lactis*, révèle que le gène déterminant la résistance à la nisine est situé sur un plasmide.

Cette émergence de bactéries pathogènes résistantes à la nisine sème le doute quant à l'utilisation de bactériocines comme biopréservatif alimentaire. A cela, on pourrait ajouter trois facteurs limitants qui réduisent leur efficacité dans les aliments :

- Les bactériocines sont très peu actives contre les bactéries à Gram négatif, les levures et les moisissures;
- Elles ne sont pas efficaces contre toutes les bactéries pathogènes à Gram positif (cellules végétatives et spores). Leur spectre d'activité varie avec la nature de la matrice alimentaire.
- Il peut exister au sein des souches de bactéries à Gram positif sensibles, des mutants insensibles pouvant croître en présence de bactériocines (Hanlin et al. 1992).

Cependant, l'intérêt croissant du public pour les additifs de conservation d'origine biologique, stimule les recherches sur d'autres bactériocines plus efficaces (Ennahar et al. 2000). Ainsi, pour contourner le phénomène de résistance aux bactériocines, on préconise dans le domaine alimentaire, l'utilisation combinée de plusieurs peptides antimicrobiens d'origine diverse et adaptés aux conditions de la matrice alimentaire. Cela crée un effet synergique d'activité contre de nombreux pathogènes alimentaires (Luders et al. 2003, Mulet-Powell et al. 1998). Afin d'éliminer des bactéries indésirables dans les aliments, O'Sullivan et al. (2003) ont proposé l'introduction de

bactériocine par application de cultures de cellules productrices de plusieurs bactériocines.

De nouvelles techniques d'inhibition de croissance de microorganismes pathogènes ou d'altération des aliments sont désormais utilisées. Leur principe est basé sur la combinaison des traitements physiques avec les bactériocines. Plusieurs études dans ce sens ont montré l'existence d'un effet synergique d'inhibition létale d'une association de la pression hydrostatique qui permet la destruction de tout microorganisme au-delà d'une pression de 200 MPa, avec des bactériocines de bactéries lactiques sur des pathogènes à Gram positif et à Gram négatif (Kalchayanand et al. 2004, Alpas et al. 1999, Huben et al. 1996).

Sur le plan clinique, de nouvelles thérapies intégrant de nouveaux agents antimicrobiens sont attendus pour freiner ou prévenir la résistance aux antibiotiques. Les mutacines, objet de notre étude, tout comme les lantibiotiques présentent l'avantage de ne pas induire de réponse immunologique à cause de leur faible masse moléculaire (Furmanek et al. 1999). Plusieurs bactériocines dont la nisine subissent des phases d'étude clinique finale en vue d'envisager leur utilisation thérapeutique humaine et pharmaceutique en tant que nouvelle classe d'antibiotique.

1.4. *Streptococcus mutans*

La cavité buccale est colonisée par une multitude d'espèces bactériennes qui se développent naturellement et dont la composition est caractéristique. Parmi les bactéries résidentes de la plaque dentaire, les streptocoques du groupe *mutans* sont les plus étudiés à cause de leur rôle étiologique dans la carie dentaire (Loesche, 1986), ils représentent en moyenne 50% de la flore de la plaque dentaire. *S. mutans* est actuellement confiné comme un agent pathogène de niveau II (Agence de santé publique Canada, 2004).

Le pouvoir pathogène de *Streptococcus mutans* serait associé à plusieurs de ses facteurs de virulence qui permettraient son omniprésence dans la microflore buccale au détriment d'autres souches ou autres espèces bactériennes. Sa capacité à produire de l'acide lactique, l'acidogénicité, et son habileté à survivre à de bas pH, l'acidorésistance (Wilkins et al. 2002, Quivey et al. 2000), ainsi que la production de peptides antimicrobiens appelés mutacines par *S. mutans* contribueraient aussi à la pathogenèse de cette bactérie (Kleinberg, 1982). *S. mutans* fermente le sucrose de préférence, pour produire de grandes quantités d'acide et de polysaccharide extracellulaire qui jouent un rôle dans l'adhésion des cellules à la plaque dentaire (Kiramitsu, 1993; Loesche, 1986). La production de mutacine par *S. mutans* pourrait prévenir la colonisation de la plaque dentaire par des bactéries pathogènes transitoires comme *Streptococcus pneumoniae* (Qi et al. 1999).

Le séquençage du génome de *S. mutans* a été achevé et publié (Ajdic et al. 2002). Il a été réalisé à l'aide de la souche *S. mutans* UA159 de sérotype c. À l'opposé d'autres

bactéries à Gram positif séquencées jusqu'à maintenant, *S. mutans* peut métaboliser une plus grande variété de carbohydrates, mono et disaccharides. Malgré le fait que la souche *S. mutans* UA159 ne soit pas productrice de bactériocine (Chen et al. 1999), cinq gènes d'expression de bactériocine, similaires aux gènes de régulation (*scnK* et *scnR*) et aux gènes d'immunité (*scnG*, *scnE*, et *scnF*) de l'opéron de biosynthèse de la streptococcine A-FF22 de *S. pyogenes* ont été retrouvés dans son génome (Ajdic et al. 2002). Cependant, aucun gène similaire aux gènes *scnM* et *scnT* jouant un rôle dans la maturation et le transport respectivement, n'a été retrouvé; ce qui signifie l'existence d'un mécanisme différent de transport pour cette bactériocine, ou simplement une incapacité de cette souche à la produire.

S. mutans tout comme *S. pneumoniae* possède dans son génome des gènes de compétence essentiels à sa transformation naturelle (Ferretti et al. 2004). Chez plusieurs streptocoques, y compris *S. mutans*, cette compétence est régulée par un mécanisme nommé quorum sensing qui lui-même est régi par des inducteurs encodés sur les gènes *comY* et *comC*. Ce quorum sensing serait très important pour la formation de biofilm et dans l'acidorésistance attribuées à *S. mutans* (Merritt et al. 2005, Aspiras et al. 2004). Qi et al. (2005) ont démontré à partir d'une culture mixte, que *S. mutans* pouvait acquérir un fragment d'ADN de sa niche écologique pour induire l'expression coordonnée de la compétence et des gènes de production de mutacines via un CSP (competence-stimulating peptide).

1.5. Les mutacines

La production de bactériocines par des souches de *S. mutans* fut rapportée par Kelstrup et Gibbons dès 1969. Pour les différencier des bactériocines produites par d'autres streptocoques, le nom de « mutacine » a été proposé et accepté. Les mutacines sont donc des bactériocines produites par *Streptococcus mutans*, bactérie indigène de la flore buccale (Hamada et Ooshima, 1975). Fabio et al. (1987), ont souligné l'importance de la production des mutacines dans la préservation de l'équilibre de la microflore buccale et de la pathogénicité de *S. mutans*. Dans le même sens, Kamiya et al. (2005) ont révélé que la production de mutacines jouerait un rôle clinique important dans la colonisation de *S. mutans* et que leur diversité serait associée avec l'évolution des différentes lignées de *S. mutans* (Balakrishnan et al. 2002).

Les mutacines ont démontré une activité inhibitrice contre des espèces apparentées à la souche productrice mais aussi contre plusieurs bactéries à Gram-positif (Parrot et al. 1990).

1.5.1. Classification des mutacines

Un certain nombre de classifications de mutacines ont été proposées à date. Dès 1969, Kelstrup et Gibbons sont les premiers à effectuer une classification des bactériocines en se basant sur leur spectre d'inhibition, la morphologie de leur zone d'inhibition, leur sensibilité au chloroforme et à certaines enzymes. Kelstrup et Funder-Nielsen (1977) divisèrent les mutacines en deux groupes en fonction de leur sensibilité à la

chaleur et à leur poids moléculaire. Ainsi, un des groupes dont le poids moléculaire culminait à plus de 10 000 Da, était inactivé par la chaleur après une exposition à 80°C pendant 20 min. Tandis que le second groupe contenait des peptides thermostables de poids moléculaire inférieur à 10 000 Da.

Bondi et al. (1991) ont séparé 55 souches de *S. mutans* en cinq types en s'appuyant sur les différences de leur activité inhibitrice envers neuf streptocoques oraux, leur sensibilité à la chaleur, au chloroforme ainsi qu'à l'activité de diverses protéases. Dans ce cas, les mutacines produites par les souches de type II et V étaient sensibles à la chaleur (80°C durant 20 min) et au chloroforme, alors que les mutacines issues des souches de type III et IV étaient résistantes à la chaleur et au chloroforme. Seules les mutacines produites par les types III et V étaient sensibles aux protéases.

Les souches de type I ne produisaient aucune mutacine active contre les neuf streptocoques oraux indicateurs. Caufield et al. (1985) avaient dans un premier temps inventorié leurs souches productrices de mutacines, possédant un plasmide de 5,6 kDa, en deux groupes, I et II, sur la base de leur spectre d'activité et de l'immunité spécifique de la souche productrice d'un groupe envers leurs bactériocines homologues. Ils observèrent par la suite que la production de mutacine était indépendante du plasmide détecté et que les souches du groupe II produisaient des mutacines en milieu liquide alors que celles du groupe I en étaient incapables (Caufield et al. 1990).

Morency et al. (1995) ont classifié à l'aide d'un test d'antagonisme différé 24 groupes notés de A à X parmi les 86 souches productrices de mutacines en fonction de leur spectre d'activité envers 12 streptocoques oraux indicateurs, et envers elle-même. La même équipe a finalement répertorié en 2001, 11 groupes de leurs souches productrices de mutacines ou de lantibiotiques selon leur spectre d'activité envers une diversité de pathogènes bactériens à Gram positif et à Gram négatif.

Balakrishnan et al. (2002) ont regroupé 16 souches de *S. mutans* provenant de la Nouvelle-Zélande, d'Amérique du Nord et d'Europe, en quatre groupes, A à D, sur la base des différences dans leur spectre d'activité observé sur un test d'antagonisme différé effectué envers les souches productrices homologues (test de présence d'une auto-immunité) et envers deux souches indicatrices, *Staphylococcus aureus* 46 et *Enterococcus faecium* TE1. De plus, des bactériocines de chaque sous type ont été isolées et leur caractérisation préliminaire a confirmé l'existence d'au moins quatre types de mutacines distinctes.

Bekal-Si et al. (2002) ont récemment confirmé la diversité des bactériocines produites par les souches de *S. mutans* classifiées par Morency et al. (1995) par une analyse génotypique utilisant des sondes d'acides nucléiques dérivées des mutacines 1140 (mutacine III) et J-T8 (mutacine II). Ils démontrèrent que les souches productrices de mutacine *S. mutans* CM7, Ny266 et 22A présentaient une portion de séquence de gène similaire à celle du gène codant pour la mutacine 1140. Par contre, les souches de *S. mutans*

29B et UA96 présentait une portion de séquence de gène identique à celle du gène codant pour la mutacine II (J-T8).

L'étude de Longo et al. (2003) confirma également la diversité génétique des mutacines. Cette étude révéla que les patrons du spectre d'inhibition produits par des génotypes distincts de *S. mutans* sont indépendants du degré de similarité génétique, mesuré par Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) des souches testées.

1.5.2. Mode d'action des mutacines

Le mode d'action des mutacines varie en raison de leur diversité. Cependant, le mécanisme d'action de plusieurs d'entre-elles n'est pas encore élucidé. Tagg et al. (1976), ont supposé que la première étape du mode d'action des bactériocines nécessite leur attachement à la surface de récepteurs des bactéries sensibles. Mais à part le lipide II qui agit comme molécule d'ancrage pour la nisine (Breukink et de Kruijff, 1999) et l'étude de Franker (1980) qui a mis en évidence la présence de récepteurs protéiques grâce à l'obtention de mutants résistants à la mutacine GS-5, l'attachement à un récepteur n'a été démontré pour aucune mutacine. L'action inhibitrice des mutacines sur les cellules cibles conduit à l'inhibition de la synthèse de l'ADN, l'ARN et des protéines (Hamada et al. 1986, Takada et al. 1984).

1.5.3. Les mutacines de *S. mutans* caractérisées

1.5.3.1. Mutacine B-Ny266

La mutacine B-Ny266 est produite par *S. mutans* Ny266 (Morency et al. 1991), initialement connue sous le nom de *S. mutans* T2, elle a été isolée en Australie par Rogers en 1976. La mutacine B-Ny266 mature serait constituée de 22 acides aminés et sa masse moléculaire déterminée par spectroscopie de masse a été évaluée à 2270 Da. Sa séquence peptidique a été obtenue par dégradation d'Edman après une dérivation du peptide à l'éthanthiol alcalin. Cependant, pour des raisons inconnues, le vingt-deuxième acide aminé n'a pas été déterminé. La mutacine B-Ny266 possède plusieurs acides aminés modifiés dont deux lanthionines, une β -méthyllanthionine, une 2,3-didéhydroalanine, une 2,3-didéhydrobutyrine et une S-(Z)-2-aminovinyl-D-cystéine. La mutacine B-Ny266 est de ce fait une bactériocine appartenant à la classe des lantibiotiques (Mota-Meira et al. 1997). Son alignement de séquence en acides aminés diffère par cinq acides aminés par rapport à celle de l'épidermine et de la gallidermine, et par seulement deux acides aminés par rapport aux mutacines III et 1140.

Il existe une forte probabilité que les mutacines B-Ny266, A-CM7, 1140 et T-22A soient similaires comme le confirme une étude de Bekal-Si Ali et al. (2002), qui réalisa l'hybridation d'une sonde d'ADN créée à partir de la séquence peptidique de la mutacine 1140 avec les souches CM7, Ny266 et 22A. L'analyse de la séquence d'un insert de 1,9 kb a permis d'identifier trois cadres de lecture ouverts (Open Reading Frame; ORFs) transcrits

dans la même direction. Le premier ORF code pour une protéine de 63 acides aminés identiques à 87% à LanA de *S. mutans* JH1140 et à MutA de *S. mutans* UA787. Il a d'ailleurs été dénommé *lanA*. Le deuxième ORF code pour une protéine de 64 acides aminés identiques à 57,4% à LanA de *S. mutans* Ny266 et cette protéine a été nommée LanA'. Le gène de structure, *mutA* dans les souches T8 et UA787, respectivement, est précédée par le gène *mutR* codant pour une protéine de régulation. Par contre, une analyse de la séquence de l'ADN de la souche Ny266, jusqu'à une région de 717 pb en amont de *lanAA'* a révélé la présence de plusieurs codons stop dans tous les cadres de lecture possibles, démontrant ainsi l'absence d'un gène de régulation équivalent à ceux trouvés dans les souches UA787 et T8. De plus, une délétion de 50 pb a été détectée dans la séquence en amont de *lanA* chez la souche Ny266 par comparaison avec la région similaire des souches JH1140 et UA787. Sauf que cette région présente un haut taux des bases A+T (>80%) qui pourrait être impliquée dans une activité promotrice de transcription de l'opéron de biosynthèse de la mutacine B-Ny266.

1.5.3.2. Mutacine 1140

La mutacine 1140 est produite par *S. mutans* JH1140, un « mutant spontané » de *S. mutans* JH1000 (Hillman et al. 1998). L'analyse de séquence a conduit à l'identification de quatre cadres de lecture ouverts incluant deux (*lanA* et *lanB*) qui présentent une homologie avec le gène de structure (*epiA*) de *Staphylococcus epidermidis* et le gène modifié (*epiB*) qui code pour la biosynthèse de l'épidermine. La mutacine 1140 mature est constitué de 22

acides aminés et possède une masse moléculaire de 2263 Da. Elle diffère par six acides aminés de l'épidermine et par deux acides aminés de la mutacine B-Ny266. Toutefois, la mutacine 1140 diffère de l'épidermine au niveau des moitiés N-terminales de leur structure secondaire tandis que les ponts disulfures des mutacines 1140 et B-Ny266 sont situés au même endroit (Hillman et al. 1998).

Les gènes structuraux de la mutacine 1140 et de la mutacine III sont identiques (Hillman et al. 1998). Il a été suggéré que les produits des gènes *mutB* et *lanB*, les enzymes de modification des lantibiotiques, mutacines III et mutacine 1140, soient extrêmement différents l'un de l'autre. La séquence partielle des protéines révèle une taille de 990 acides aminés pour MutB (mutacine III), tandis que LanB (mutacine 1140) ne contiendrait que 184 acides aminés. Cependant, la séquence du gène *lanB* n'a pas été déterminée au complet. Mais sur les 184 acides aminés de LanB, 100% d'identité ont été observées avec MutB. La séquence complète de ce gène pourrait donc établir l'homologie entre MutB et LanB.

Plus récemment, Smith et al. (2003) ont établi la structure et la dynamique de la mutacine 1140 par chromatographie et spectroscopie de masse. Cette étude révèle que la mutacine 1140 forme une structure petite et compacte. Les données fournies par des études de résonance magnétique nucléaire et les simulations de dynamique moléculaire en condition restreinte, montrent que la mutacine 1140 peut adopter une multitude de structures.

1.5.3.3. Mutacine I

La mutacine I est produite par *S. mutans* CH43 (Qi et al. 2000a). La production d'une substance antibactérienne identique par la souche *S. mutans* UA140 a récemment été démontrée par Qi et al. (2001). Le peptide mature est constitué de 24 acides aminés et possède une masse moléculaire de 2364 Da. Six sérines déshydratées ont été révélées après séquençage du peptide et quatre d'entre elles participent probablement à la formation de ponts thioéther. Quatorze gènes jouant un rôle dans la biosynthèse de la mutacine I ont été identifiés.

Les gènes codant pour les mutacines I et III semblent étroitement reliés du point de vue de leur structure nucléique. La comparaison des séquences peptidiques des mutacines I et III laisse suggérer le même patron pour la formation des ponts thioéther. Par contre, d'importantes différences existent entre les deux mutacines. Ainsi, la modification à l'éthanthiol de la mutacine I entraîne une coupure entre les positions N-16 et P-17 de la molécule qui génère deux fragments (Qi et al. 2000a), alors que la même réaction n'affecte nullement l'intégrité de la mutacine III. Une comparaison entre les deux mutacines révèle une différence majeure au niveau de la séquence en acides aminés dans la région charnière (T-12 à P-17). Il a été suggéré que la région N-16 et P-17 de la mutacine I (absente de la mutacine III) serait certainement impliquée dans la formation de boucle, alors que la région A-12 de la mutacine III participerait plutôt à la formation d'une hélice α (Qi et al. 2000a). Les mutacines I et III diffèrent également dans leur hydrophobicité et leur niveau d'activité antimicrobienne.

1.5.3.4. Mutacine II

La mutacine II (ou mutacine J-T8) est produite par *S. mutans* T8. C'est un petit peptide hydrophobe de masse moléculaire de 3245 Da, formé de 27 acides aminés et qui appartient à la classe des lantibiotiques (Krull et al. 2000, Novak et al. 1994). Les modifications post-transcriptionnelles incluent deux lanthionines, une β -méthyllanthionine et un résidu α , β -déshydraté (Novak et al. 1996). La séquence de 20 acides aminés a été obtenue grâce à une combinaison de la dégradation d'Edman, de la réaction du peptide avec l'éthanthiol en condition alcaline, ainsi qu'une digestion à la trypsine. La comparaison de cette séquence avec celle déduite de la séquence génétique a permis de déduire les sept acides aminés manquants de la mutacine II (Woodruff et al. 1998). Ainsi, le gène structurel *mutA* encode un prépropeptide de 53 acides aminés qui consiste en une séquence signal N-terminale de 26 acides aminés et un propeptide C-terminal de 27 acides aminés. Le prolantibiotique mutacine II montre des similarités de séquences en acides aminés avec plusieurs autres lantibiotiques de type A (streptococcine A-FF22, streptococcine A-M49, salivaricine A, variacine et lacticine 481) (Woodruff et al. 1998). L'analyse de la séquence en acides aminés de la région N-terminale, résidus 1 à 8, indique que celle-ci forme une hélice α de nature amphipatique, reliée à la partie C-terminale via une région charnière rigide (Novak et al. 1997). La structure proposée comprend trois ponts thioéther, et ressemble à celle des lantibiotiques de type AII et plus particulièrement à celle de la lacticine 481 (Krull et al. 2000). Les lantibiotiques de type AII tuent les cellules cibles en détruisant la membrane cytoplasmique via la formation de pores.

La mutacine II inhiberait le métabolisme énergétique des cellules sensibles en dépolarisant de façon transitoire le potentiel électrique transmembranaire ($\Delta\Psi$), le gradient de pH transmembranaire (ΔpH), et en inhibant partiellement le transport des acides aminés (Chikindas et al. 1995). Cette fonction de la mutacine II la rapproche plutôt des lantibiotiques de type B en dépit des similarités de séquences partielles avec des lantibiotiques de type A.

Les gènes codant pour la production de la mutacine II ont été localisés sur le chromosome bactérien (Caufield et al. 1990). Sept gènes jouant un rôle dans la biosynthèse de mutacine II ont été identifiés (*mutR*, -A, -M, -T, -F, et -G). Ces gènes sont organisés en opéron qui peut être transmis en bloc à une souche non productrice (Chen et al. 1999). Le gène *mutA* code pour la prépromutacine (Woodruff et al. 1998), mais Qi et al. (1999b) ont démontré que les gènes de biosynthèse de la mutacine II étaient organisés en deux opérons. L'opéron *mutAMTFEG* qui est transcrit à partir du promoteur de *mutA*. Le gène de régulation *mutR*, est transcrit comme un second opéron. Cette même étude a rapporté que l'activation du promoteur de *mutA* était régulée par un composant du milieu de culture présent dans le TSBYE. L'expression des promoteurs de *mutA* et *mutR* respectivement, semblait indépendante de la phase de croissance des cellules, alors que la production de mutacine II s'effectuait en début de phase stationnaire. Ces résultats suggèrent que l'expression de l'opéron de la mutacine II est régulée par un système complexe nécessitant des contrôles transcriptionnels, post-transcriptionnels ou même post-traductionnels.

Chen et al. (1998) ont également mis au point un système de remplacement de gène chez *S. mutans* afin d'élucider le rôle de la spécificité de certains acides aminés de la séquence de la mutacine II sur l'activité antimicrobienne du peptide antibiotique. Il fut ainsi montré qu'en plus des acides aminés déshydratés et des ponts thioéther, la région charnière était essentielle à l'activité biologique, la biosynthèse ou l'exportation du peptide. Aussi, la partie N-terminale du peptide semblait être essentielle à certaines étapes du processus de biosynthèse du lantibiotique. De la même façon, le rôle des résidus conservés dans la séquence leader N-terminale du prépeptide de la mutacine II dans la production d'un prolantibiotique actif a été étudié (Chen et al. 1998). Les résultats rapportèrent que certains résidus étaient essentiels pour la biosynthèse de la mutacine, tandis que d'autres sont importants pour un taux optimum de biosynthèse.

1.5.3.5. Mutacine III

La mutacine III est produite par *S. mutans* UA787 (Qi et al. 1999a). La mise en évidence de sa structure peptidique par la dégradation d'Edman a échoué, créant un blanc à la troisième position et étant bloquée à la cinquième. Ceci est caractéristique de la présence d'acides aminés modifiés dans la séquence d'un peptide. La mutacine III appartient de ce fait au groupe des lantibiotiques comme la mutacine II. La séquence des 22 acides aminés du peptide mature a donc été déduite de la séquence génétique. Le poids moléculaire déterminé par spectrométrie de masse est de 2266 Da.

Le peptide mature présente de grandes similarités de séquence avec les peptides du groupe de l'épidermine (mutacine 1140, mutacine B-Ny266, épidermine, gallidermine). De plus, la mutacine III et la mutacine 1140 sembleraient identiques au niveau des gènes structuraux. Toutefois, les séquences encore incomplètes des gènes *orfX* et *lanB* de la mutacine 1140 ne peuvent confirmer cette hypothèse (Bekal-Si Ali et al. 2002, Qi et al. 1999a).

1.5.3.6. Mutacine IV

La mutacine IV est produite par *S. mutans* UA140. Elle est constituée de deux peptides (Qi et al. 2001). Le peptide A, codé par le gène *nImA*, est composé de 44 acides aminés et possède une masse moléculaire de 4169 Da. Le peptide B, codé par le gène *nImB* est constitué de 49 acides aminés et possède une masse moléculaire de 4826 Da. La difficulté rencontrée lors de la séparation des deux peptides par HPLC, a conduit à déduire leur séquence à partir de la séquence génétique. Par ailleurs, le peptide mature codé par *nImB* montre une grande similarité de séquence avec la mutacine N.

1.5.3.7. Mutacine N

La mutacine N produite par *S. mutans* N n'appartient pas à la classe des antibiotiques (Balakrishnan et al. 2000). Elle est constituée de 49 acides aminés et possède un poids moléculaire de 4806 Da. Il existe une certaine homologie entre sa structure en acides aminés et le domaine IIc de l'hypothétique enzyme sucre-phosphotransférase de

Mesoplasma florum ATCC 33453. Il existe également une certaine homologie entre la mutacine N et le peptide B de la mutacine IV.

1.5.4. Autres mutacines produites par *S. mutans*

La **mutacine H-29B** est produite par *S. mutans* 29B (Nicolas et al. 2004, 2006). La mutacine H-29B a été purifiée par une succession de chromatographies hydrophobes. Sa masse moléculaire a été déterminée par spectrométrie de masse et évaluée à 3247 Da. La séquence peptidique a été obtenue suite à un traitement alcalin à l'éthanedithiol préalable au séquençage N-terminal du peptide par la dégradation d'Edman. Le peptide est constitué de 24 acides aminés dont 4 acides aminés modifiés. La séquence du peptide est identique à celle de la mutacine II produite par *S. mutans* T8.

L'efficacité de la mutacine H-29B a été comparée aux lantibiotiques, mutacine B-Ny266 et nisine A, et aux antibiotiques conventionnels, oxacilline et vancomycine, contre des souches pathogènes alimentaires et cliniques de *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus*. La mutacine H-29B s'est montrée plus efficace que la nisine A et l'oxacilline, aussi efficace que la mutacine B-Ny266 mais moins efficace que la vancomycine contre les souches pathogènes testées.

La **mutacine VSM43** est produite par *S. mutans* VSM43 (Rasool et Ahmad, 2003). Sa masse moléculaire déterminée par dialyse est estimée à 12 kDa. Elle s'est montrée sensible aux protéases, demeure active au pH compris entre 2-8, mais perd son activité

après chauffage à 100°C pendant 30 min. Le spectre d'activité de la mutacine VSM43 inclut d'autres souches de *S. mutans*, plusieurs bactéries à gram-positif ainsi que certaines bactéries à gram négatif.

La **mutacine C67-1**, produite par *S. mutans* C67-1 (Parrot et al. 1989), posséderait une masse moléculaire avoisinant 3500 Da (Parrot et al. 1990). Elle s'est montrée sensible aux enzymes protéolytiques α -chymotrypsine, pronase E, protéinase K, la trypsine et à une glycosidase, l' α -amylase (Parrot et al. 1990). Aucun plasmide n'a été détecté chez la souche productrice suggérant la nature chromosomique des gènes codant pour la mutacine C67-1. Les patrons de restriction de l'ADN chromosomique des souches C67-1 et T8 ont montré de grandes similarités. Ceci suppose que les deux souches soient génétiquement apparentées (Parrot et al. 1990).

La **mutacine Ny257-S** est produite par *S. mutans* Ny257-S. Sa masse moléculaire est estimée entre 12000 et 14000 Da (Parrot et al. 1990). La mutacine Ny257-S est insensible à la phospholipase C, mais sensible à l' α -amylase, la pronase E, la protéinase K, l' α -chymotrypsine et la trypsine. Comme pour la mutacine C67-1, aucun plasmide n'a été découvert chez la souche productrice, suggérant de la nature chromosomique des gènes codant cette mutacine (Parrot et al. 1990).

La **mutacine JH1000** est produite par *S. mutans* JH1000. C'est l'étude du mutant spontané JH1140 qui a permis d'établir des résultats subséquents. Sa masse moléculaire

déterminée par dialyse est inférieure à 1000 Da (Hillman et al. 1984). Cette mutacine est insensible à la lipase, au lysozyme, à la Dnase et à la RNase, mais elle est inactivée par un traitement à la trypsine et partiellement inactivée par la pronase E; ce qui révèle sa nature protéique. Son spectre d'activité inclut de nombreuses souches de *S. mutans* ainsi que diverses espèces de streptocoque, de staphylocoque, de lactobacille et d'actinomycètes (Hillman et al. 1984).

La **mutacine GS-5**, produite par *S. mutans* GS-5, possède une masse moléculaire estimée par dialyse supérieure à 20000 Da. Elle est sensible à la trypsine et à la pronase. La mutacine GS-5 reste insensible à un traitement de 100°C pendant 10 min, aux pH de 2 à 7, mais aux pH supérieurs l'activité diminue et est complètement détruite à pH 11 (Paul et Slade, 1975).

La **mutacine Rm-10** a été isolée à partir d'un surnageant de culture de *S. mutans* Rm-10 (Fukushima et al. 1982). Une fraction purifiée a permis de déterminer son poids moléculaire par centrifugation analytique; ce dernier est de 973 kDa. La mutacine était probablement complexée avec une autre composante bactérienne pour avoir un poids moléculaire si élevé. La mutacine Rm-10 est acide avec un point isoélectrique (pI) estimé à 3,6 (Fukushima et al. 1982). L'activité de la mutacine est résistante à la phospholipase C, au lysozyme, à la papaine et à la pepsine mais elle demeure sensible à la trypsine, à l' α -chymotrypsine, et à la pronase (Fukushima et al. 1983). La mutacine Rm-10 est stable et active de pH 6,0 à 11,0; mais cette activité est complètement perdue à un faible pH. La

mutacine Rm-10 est partiellement détruite après un chauffage à 100°C pendant 10 min, mais pas après 3 min (Fukushima et al. 1983). Elle agirait en inhibant la synthèse des protéines, de l'ADN et de l'ARN (Fukushima et al. 1985). La mutacine Rm-10 s'est montrée active contre tous les sérotypes de *S. mutans* testés à l'exception des streptocoques de l'espèce *S. salivarius*. D'autres espèces comme *S. aureus*, *B. subtilis*, *Actinomyces viscosus* et *Actinomyces naeslundii* se sont montrées sensibles à la mutacine Rm-10 (Fukushima et al. 1983).

Des études réalisées à l'aide du sérum humain ont révélé une importante activité chimiotactique de la mutacine Rm-10 envers les leucocytes et les monocytes (Tsukamoto et al. 1990).

La **mutacine C3603**, produite par *S. mutans* C3603, possède une masse moléculaire estimée à 4800 Da (Ikeda et al. 1982). Son point isoélectrique (pI) est de 10, ce qui en fait une protéine basique. La mutacine est résistante à la pronase, à la papaine, à l' α -amylase, à la phospholipase C et à la trypsine; mais elle est partiellement sensible à l' α -chymotrypsine et à la pancréatine (Ikeda et al. 1982).

L'activité de la mutacine n'est pas affectée par des pH compris entre 1,0 et 12,0. Elle reste stable à un traitement de 100°C pendant 10 min au pH 2,0 à 7,0 et de 121°C pendant 15 min à un pH de 4,0 (Ikeda et al. 1982). Son mode d'action consisterait à inhiber la synthèse des protéines, de l'ADN et de l'ARN (Takada et al. 1984). Le spectre d'activité de la mutacine C3603 inclut de nombreux streptocoques et des bactéries lactiques. Elle a montré

une plus forte activité contre les sérotypes b, c, e et f contrairement aux sérotypes a, d et g de *S. mutans* (Ikeda et al. 1982).

La **mutacine MT3791** est produite par *S. mutans* MT3791 (Hamada et al. 1986). Elle s'est montrée résistante à la chaleur, mais elle perd son activité après un passage de 120°C pendant 60 min à l'autoclave. L'activité de la mutacine est sensible à l'action enzymatique de la papaine et de la pronase P, mais demeure insensible à la trypsine, la lipase et les nucléases (Hamada et al. 1986). La mutacine s'est montrée stable aux pHs 3,8-7,6 et après passage à la chaleur (60°C pendant 1 h). Elle a révélé une activité biologique d'inhibition de la biosynthèse des acides nucléiques et des protéines. Elle a également montré une activité inhibitrice sélective et marquée envers la croissance de souches de *S. mutans* présents au niveau de la plaque dentaire. La mutacine est active contre *S. mutans* de sérotypes c, e, f et g et contre des souches de *S. salivarius* et *S. sanguis* (Hamada et al. 1986).

La **mutacine b** est un peptide antibactérien produit par *S. mutans* BHT (Delisle, 1986). Sa masse moléculaire est comprise entre 3500 et 6000 Da. La mutacine b s'est montrée résistante aux solvants (éthanol, acétone, butanol, chloroforme (1% v/v)). Elle est également résistante après un traitement à la chaleur de 100°C pendant 15 min aux pHs 3,0 et 7,0. La mutacine b est sensible à la chymotrypsine et à la trypsine, mais elle résiste à la lipase, au lysozyme, à la papaine et à la salive filtrée (Delisle, 1986).

Deux autres bactériocines appelées **mutalipocines** (ML-I et ML-II) ont été caractérisées chez *S. mutans* 32K (Kurita et Hirasawa, 1988). Elles sont de nature lipidique et leur masse moléculaire est faible (<1000 Da). Les mutalipocines sont partiellement inactivées par un traitement à la lipase et à la phospholipase C; elles sont insensibles à l'action des enzymes protéolytiques et à la phospholipase A. Les mutalipocines restent stables à un traitement aux pHs de 3,0 à 10,0. La ML-I est sensible à un traitement de 121°C pendant 30 min à pH 7,0 alors que la ML-II est insensible aux mêmes conditions. Leur spectre d'activité est plus étroit comparé à celui d'autres bactériocines issues de bactéries à Gram-positif. Cependant, les mutalipocines démontrent un effet d'inhibition de croissance contre de nombreuses espèces de streptocoques y compris de plusieurs souches de *S. mutans* (Kurita et Hirasawa, 1988).

Tableau 1.2. Séquence N-terminale des mutacines caractérisées.

Souche productrice	mutacine	Séquence en acide aminé		Masse moléculaire ^a (Da)	Références
		Peptide leader + peptide mature			
<i>S. mutans</i> CH43, UA140	I	MSNTQLLEVLGTETFDVQEDLFAFDTTDTTIVASNDDPDTR	FSSLSLCSLGCTGVKNPSFNSYCC	2364	Qi et al., 2000a Qi et al., 2001
<i>S. mutans</i> T8 <i>S. mutans</i> UA96	II ou J-T8	NRWWQGVVPTVSYECRMNSWQHVFCTCC		3245	Krull et al., 2000 ; Balakrishnan et al., 2002
<i>S. mutans</i> 29-B	H-29B			3247	
<i>S. mutans</i> UA787	III	MSNTQLLEVLGTETFDVQEDLFAFDTTDTTIVASNDDPDTR	FKSWSLCTPGCAITGSFNSYCC	2266	Qi et al., 1999a
<i>S. mutans</i> JH1140	1140	MSNTQLLEVLGTETFDVQEDLFAFDTTDTTIVASNDDPDTR	FKSWSLCTPGCAITGSFNSYCC	2263	Hillman et al., 1998
<i>S. mutans</i> Ny266	B-Ny266	FKSWSFCTPGCAITGSFNSYCC		2270	Mota-Meira et al., 1997
<i>S. mutans</i> UA140	IV NlmA	MDTQAFEQFDVMDSQTLSTVEGG KVSGGEAVAA AIGICATA	SAAIGGLAGATLVTPYCVGTWGLIRSH	4169	Qi et al., 2001
	NlmB	MELNVNNYKSLTNDELSEVFGG DKQAADTFLS AVGGAAS	GFTYCASNGVWHPYILAGCAGVGAVGSVVFPH	4826	
<i>S. mutans</i> N	N	SRQAADTFLS SGAYGAAKGVTARASTGVYVVPATLVALGV	YGAGLNIAFP	4806	Balakrishnan et al., 2000
<i>S. mutans</i> M19	M19	NRWWQGVV*		n.d	Balakrishnan et al., 2002

^a Masse moléculaire déterminée par spectrométrie de masse. * Séquence déterminée partiellement.

n.d : non déterminée. Pour la mutacine IV : en gras souligné, portion du peptide déterminée par séquençage N-terminal.

Pour la mutacine N : en contour marqué, portion de séquence similaire à une portion de séquence de NlmB (mutacine IV).

Pour les mutacines III, 1140 et B-Ny266, les acides aminés différents sont en contour marqué.

1.5.5. Perspectives d'application des mutacines

Les résultats obtenus à la suite de la caractérisation de plusieurs mutacines ont révélé l'ampleur de leur spectre d'activité sur de nombreux pathogènes et laissent présager un réel espoir quant à leur imminente recommandation clinique ou thérapeutique.

Ainsi, sur le plan agro-alimentaire, les mutacines utilisées comme bioconservateur naturel pourraient garantir la sécurité des aliments comme le confirme des études de Morency et al. (2001) ainsi que Smith et al. (2003) qui ont démontré que des souches productrices de mutacines inhibaient la croissance de nombreux streptocoques et entérocoques testés, incluant des bactéries résistantes aux antibiotiques, de même que des pathogènes alimentaires tels que *Listeria monocytogenes* et *Clostridium sporogenes*. Cependant, serait-il possible qu'une substance antimicrobienne serve à la fois dans le traitement des infections et dans le domaine agro-alimentaire? La vulgarisation des mutacines au niveau alimentaire pourrait favoriser l'éclosion du phénomène de résistance croisée entre les souches pathogènes médicales et alimentaires avec comme conséquence à long terme la diminution de l'efficacité thérapeutique des mutacines.

Certaines bactéries à Gram-négatif régulièrement impliquées dans des infections chez l'homme et résistantes au traitement antibiotique comme *Neisseria gonorrhoeae*, *Campylobacter jejuni* et *Helicobacter pylori* (Moore et al. 2006, Khetsuriani et al. 2006), se

sont montrées sensibles face à certaines mutacines. Le développement des mutacines en tant qu'antibiotique pourrait donc s'avérer intéressant. D'ailleurs, la mutacine B-Ny266 a montré un spectre d'activité plus étendu que d'autres substances étudiées (nisine A, oxacilline, vancomycine) en se montrant active contre des souches résistantes à la nisine A : *L. monocytogenes* Scott A, *Pediococcus acidilactici*; à l'oxacilline : *N. gonorrhoeae*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*; et à la vancomycine : *N. gonorrhoeae*, *E. faecalis* (Mota-Meira et al. 2000).

L'action de cette mutacine comme antibiotique efficace *in vivo* a récemment été rapportée par une étude qui a montré la capacité de cette mutacine à prévenir une infection intra péritonéale induite par *Streptococcus aureus* dans un modèle murin (Lavoie et al. 2005). Un autre aspect important est qu'aucun mutant résistant aux mutacines n'a été identifié à date (Smith et al. 2000, Morency et Lavoie, travaux non publiés; Dagry, 1996), comparativement à l'obtention confirmée de mutants résistants à la nisine (Crandall et Montville, 1998; Mazzotta et al. 1997).

Les mutacines I et III ont montré un potentiel inhibiteur plus élevé que la nisine contre les pathogènes *S. aureus* résistant à la méthicilline (MRSA), *E. faecium* résistant à la vancomycine (VRE) et *Staphylococcus epidermidis*, avec des concentrations minimales inhibitrices (CMIs) inférieures à 10 µg/mL (Qi et al. 2000b, 1999). La même étude révèle que les mutacines I à IV ont inhibé efficacement les streptocoques du groupe A et *Streptococcus pneumoniae* pénicillino-résistant avec des CMIs inférieurs à 1 µg/mL.

Les mutacines représenteraient donc « un gisement » d'antibiotiques exploitables dans la lutte contre les bactéries multirésistantes. De surcroît, elles agissent à faible dose. Les mutacines les moins actives contre certaines cibles pourraient tout de même être utilisées en combinaison avec d'autres mutacines plus actives afin d'obtenir une activité synergique sur les pathogènes indésirables.

Les mutacines ont été utilisées avec succès dans la lutte et la prévention des caries dentaires. Fukushima et al. (1985), tout comme Hirasawa et al. (1985) rapportèrent respectivement le contrôle de la croissance de pathogènes de la microflore buccale après application de la mutacine Rm-10 et de la mutacine C3603. D'autres expérimentations réalisées *in vivo* chez l'homme et les animaux ont démontré que l'application de certaines mutacines sur la plaque dentaire ou leur introduction au niveau des gencives pouvait prévenir la colonisation de la plaque par des bactéries cariogènes, et, réduire le nombre de *S. mutans* dans la plaque dentaire et par conséquent baisser significativement l'incidence de la formation des caries (Hillman et al. 2002, 2000, 1987; Loyola-Rodriguez et al. 1992, Kitamura et al. 1989, Hillman et Socransky, 1987).

1.6. Optimisation de la production des mutacines

La production difficile des mutacines en milieu liquide nous a incités à cribler une gamme de milieux, des plus simples aux plus complexes, pouvant améliorer le rendement de production et ainsi faciliter leur détection. Optimiser la production comme le suggère

Nicolas et al. (2004), nous a amené à tester l'influence des facteurs intrinsèques et extrinsèques sur la production des mutacines.

1.6.1. Influence des facteurs intrinsèques

Le taux de production de la bactériocine en général et de la mutacine en particulier peut varier selon l'espèce ou la souche (Jack et al. 1995). Cette différence de production pourrait être expliquée par la spécificité des mécanismes de régulation de biosynthèse attribués à chaque souche, mais aussi par la capacité des cellules à survivre lors de l'accumulation de bactériocine produite dans le milieu.

Lorsque la mutacine produite atteint un certain seuil, elle peut aussi freiner sa propre production par l'activation du système de régulation négative, et ce malgré la disponibilité des nutriments dans le milieu. Kim et al. (1997) ont trouvé que la production de nisine était inhibée par une forte concentration de nisine libérée dans le milieu, ce qui suggère l'existence d'un seuil ou d'un plafond de production qui ne peut être franchi malgré l'optimisation des conditions de production des bactériocines.

1.6.2. Influence des facteurs extrinsèques

Les facteurs extrinsèques regroupent tous les paramètres externes à la souche productrice, mais qui rentrent dans la composition du milieu et qui sont essentiels pour l'optimisation de la production.

1.6.2.1. Milieu de culture

La qualité du milieu de culture influence la production de mutacine. Le milieu de culture idéal pour une souche productrice devrait contenir en suffisance des sources de carbone, d'azote, des ions ainsi que certains surfactants.

1.6.2.2. Rôle des sources d'azote

De nombreuses études ont montré l'impact de la concentration et de la nature des sources d'azote sur la production de bactériocine. L'apport en azote serait plus crucial que la disponibilité en source de carbone. Kim et al. (1997) ont montré que le rendement de nisine produite pouvait augmenter avec la concentration de la source d'azote.

La nature de la source d'azote jouerait aussi un grand rôle; ainsi, les sources d'azote organique sont mieux indiquées que les sources d'azote inorganique, et augmentent le titre de production dépendamment de la souche productrice impliquée (Cabo et al. 2001, Guerra et Pastrana, 2001). Ainsi, le meilleur titre de production de la mutacine C-7A a été obtenu avec 5% d'hydrolysate de coton comparativement à l'extrait de levure et à la peptone dans les mêmes concentrations (Nicolas et al. 2004). De même Cheigh et al. (2002) ont rapporté une production plus élevée de bactériocine par *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* A164 en présence d'extrait de levure dans le milieu.

1.6.2.3. Rôle des ions et du surfactant

Il a été décrit que certains ions ou vitamines même en très faible quantité, sont déterminants pour la croissance de certaines bactéries, c'est le cas de l'acide 4-aminobenzoïque (PABA) qui est un facteur de croissance essentiel pour la culture de certains *Clostridium*. Les ions et les surfactants pourraient donc stimuler la production de bactériocine. Le cation Mg^{2+} permet l'augmentation de la production de la pédiocine AcH (Biswas et al. 1991) et celle de la nisine (Meghrous et al. 1992).

Par un mécanisme inconnu, le Tween 80 et le Tween 20, surfactants communément utilisés, peuvent stimuler la production de bactériocines (Huot et al. 1996, Matsusaki et al. 1996). Joosten et Nunez (1995) proposèrent plus tard que le Tween prévenait simplement l'adsorption de bactériocine sur les surfaces de propylène et de verre, ce qui n'augmentait qu'en apparence les titres de bactériocine obtenus. Ces détergents peuvent également augmenter la sensibilité des souches indicatrices en favorisant la liaison de la bactériocine aux cellules: le Tween 20 a augmenté la sensibilité de *Listeria monocytogenes* à la nisine (Li et al. 2002b).

1.6.3. Conditions de culture

1.6.3.1. Durée d'incubation

Il est généralement admis que la production de bactériocines se situerait en fin de phase exponentielle de croissance. Ainsi, la mutacine B-Ny266 a montré une activité détectable après 12 h d'incubation; tandis que des titres significatifs (>6400 UA/ml) ont été détecté après 24 et 48 h pour les mutacines A-CM7 et H-29B respectivement (Nicolas et al. 2004). Cependant, au delà de 48 h d'incubation, la probabilité de trouver des mutacines actives diminue à cause de l'accumulation des protéases dans le milieu (Ennahar et al. 2000) et l'appauvrissement du milieu de culture en nutriments.

1.6.3.2. Effet de l'agitation

L'agitation peut dans certains cas influencer la production de bactériocine. Chinachoti et al. (1997) ont obtenu une production de nisine Z de 68,5 mg/g à 320 rpm alors qu'une agitation au dessus de 540 rpm pouvait affecter négativement la croissance et la production de nisine Z.

1.6.3.3. Influence du pH et de la température

Le pH est un point de contrôle important lors des fermentations conduisant à la production de bactériocines. La production de certaines bactériocine nécessite la stabilisation du pH autour de 5,5-6,0 (Meghrous et al. 1992, Matsusaki et al. 1996) et en

dessous de 5,0 dans d'autres cas, comme pour la plantaricine C (Yang et Ray, 1994; Barcena et al. 1998).

Par défaut de contrôleur de pH, nous avons réussi à stabiliser le pH de nos cultures en ajoutant 0,5 à 1% de CaCO₃. Certaines mutacines ont montré une meilleure activité à pH acide, c'est le cas de la mutacine B-Ny266 avec un titre de 12800 AU/ml à pH 2,0 contre 1600 AU/ml pour un pH compris entre 3-7 (Nicolas et al. 2004).

1.6.3.4. Conditions aérobies vs anaérobies

Les besoins en oxygène et l'aération peuvent parfois s'avérer déterminants pour la croissance des souches et la production de bactériocine. Ainsi, Flores et al. (2001) ont démontré que l'aération n'influençait pas directement la production de nisine, mais pouvait affecter positivement la production de biomasse.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Souches bactériennes

Les trois souches productrices de mutacine utilisées sont : *Streptococcus mutans* 123.1, *S. mutans* 136.1 et *S. mutans* F qui produisent respectivement les mutacines D-123.1, P-136.1 et U-F. *Micrococcus luteus* ATCC 272 est la souche sensible qui a été utilisée pour la détection de mutacine. Elles sont toutes issues de la collection du Dr Marc Lavoie. Toutes les souches bactériennes sont recensées dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1 : Souches bactériennes utilisées

Souches bactériennes	Bactériocine produite	Origine de la souche
<i>Streptococcus mutans</i> 123.1	mutacine D-123.1	Morency et al.1995
<i>Streptococcus mutans</i> 136.1	mutacine P-136.1	Morency et al.1995
<i>Streptococcus mutans</i> F	mutacine U-F	Kulkarni et al.1989
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 272	souche sensible	ATCC
<i>Streptococcus mutans</i> 7A	mutacine C-7A	Parrot et al.1989
<i>Streptococcus mutans</i> 5A	mutacine M-5A	Parrot et al.1989
<i>Streptococcus mutans</i> Ny257	mutacine S-Ny257	J.S van der Hoeven (Nijmegen, Netherlands)
<i>Streptococcus sanguis</i> ATCC 10556	non caractérisée	ATCC
<i>Streptococcus parasanguis</i> ATCC 15912	non caractérisée	ATCC
<i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 2735	non caractérisée	ATCC

ATCC : American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)

2.2. Milieux et conditions de culture

Le milieu TSB (Trypticase Soy Broth, Difco laboratories, Detroit, MI) additionné d'extrait de levure 0,3% (p/v) (Becton Dickinson, Cockeysville, MD) a été utilisé pour la pré-culture des souches bactériennes. Les milieux MRS (de Man Rogosa Sharp) issu de l'Institut Rosell (Montréal, Qc), M17 (Difco), BHI (Brain Heart Infusion, Difco) et le perméat de lactosérum 6% (Agropur, Granby, Québec, Canada) ont été les plus fréquemment employés pour la production de mutacine *in vitro*.

La préparation du perméat nécessite la dissolution de la poudre (6% p/v) dans de l'eau distillée. Après homogénéisation par agitation, le pH a été ajusté à 5 avec une solution d'HCl 4 N, puis stérilisé à l'autoclave pendant 15 min à 121°C. Une fois refroidit, le milieu subit une centrifugation à 10 000 x g pendant 20 min à 4°C afin d'éliminer les sels précipités. De l'extrait de levure 2% (p/v) (Institut Rosell Montréal, Qc) et 1% (p/v) de carbonate de calcium CaCO₃ (Anachemia, Montréal, Qc) sont rajoutés au surnageant et la solution finale est stérilisée à 121°C pendant 15 min.

Ces différents milieux de culture ont été utilisés seuls et/ou en combinaison avec diverses sources de carbone, d'azote, d'autres substances (ions minéraux et surfactants) à différentes concentrations afin de trouver un équilibre permettant d'améliorer le rendement de production de mutacine. Les conditions de culture (pH, température, temps d'incubation, agitation, oxygène) ont également été ajustées afin d'atteindre cet objectif. Ainsi, les milieux ont été inoculés avec les souches productrices et incubés. Les surnageants ont

ensuite été prélevés afin de détecter l'activité des mutacines après 12, 24, 48 et 72h d'incubation.

Puisque le milieu acide s'est montré plus favorable pour la détection de certaines mutacines (Nicolas et al. 2004), nous avons donc ajusté le pH de nos cultures, après croissance, à 2-3 avec une solution de HCl 4 N afin d'obtenir une meilleure activité. L'effet de la température sur la croissance et la production de mutacine a été vérifié en incubant les milieux inoculés à des températures de 25, 30, et 37°C. Cet effet a également été mesuré après chauffage des surnageants à 70°C avant leur dépôt sur tapis de *Micrococcus luteus*, souche sensible utilisée. Pour obtenir des milieux solides (gélose en pétri), il suffisait d'ajouter 1,5% d'agar ou d'agarose (Difco) à l'un ou l'autre de ces milieux.

2.3. Production et détection des mutacines en milieu liquide

Des colonies isolées de nos trois souches de *S. mutans* ont été inoculées en pré-culture dans des bouillons TSBYE puis incubées à 37°C pendant 24 h. L'inoculum (1% v/v) de pré-culture a ensuite été ajouté dans un milieu de culture frais, puis incubé afin de tester l'optimisation de la production des mutacines. Au temps indiqué, des aliquots de 1ml de la culture sont centrifugés à 10 000 x g pendant 15 minutes. Le surnageant a été testé directement sur un tapis de la souche sensible *Micrococcus luteus*. Il a également été chauffé à 70°C pendant 5-10 min avant d'être testé afin d'inactiver les protéases et de tuer les cellules productrices restantes.

Le tapis de *M. luteus* a été incubé pendant 24 h, et l'apparition des zones d'inhibition a témoigné de l'activité des mutacines présentes dans le surnageant. Si on retrouvait de l'activité, on effectuait la titration de la mutacine concernée par la méthode des dilutions critiques.

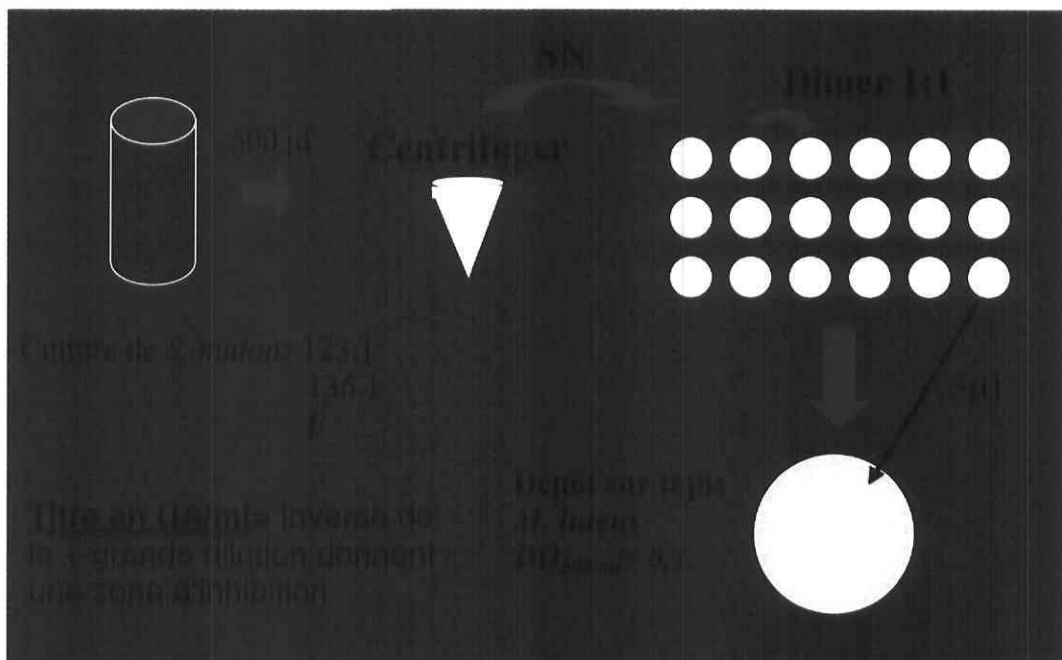
Tapis de *Micrococcus luteus*

C'est une gélose molle (0,75% agar) dans laquelle on inocule 200 µl d'une culture de *M. luteus* à densité optique DO= 0.1 à 600 nm. Cette gélose molle est ensuite coulée à la surface d'une gélose TSAYE (1,5%) en Pétri. Sur ce tapis de *M. luteus* sont déposées les fractions de surnageant en vue de détecter l'activité des mutacines (Test d'activité).

Méthodes des dilutions critiques

Elle a été utilisée pour exprimer l'activité de la bactériocine en unité arbitraire par millilitre (AU/ml). Comme le montre la figure 2.1, le principe consiste à créer sur une plaque multi-puits une dilution sérielle d'un surnageant de culture dans un milieu stérile ou un diluant (eau peptonnée), de façon à produire un effet d'extinction de l'activité de la mutacine. On a déposé ensuite 5-10 µL de chaque puit sur un tapis de *M. luteus* que l'on a incubés pendant 24 h. Le titre de la mutacine exprimé en UA/ml est l'inverse de la plus grande dilution produisant une zone d'inhibition.

Figure 2.1 : Méthode des dilutions critiques pour la titration de l'activité des mutacines.



SN : surnagent

2.3.1. Détection par réduction du chlorure de triphényl tétrazolium (TTC)

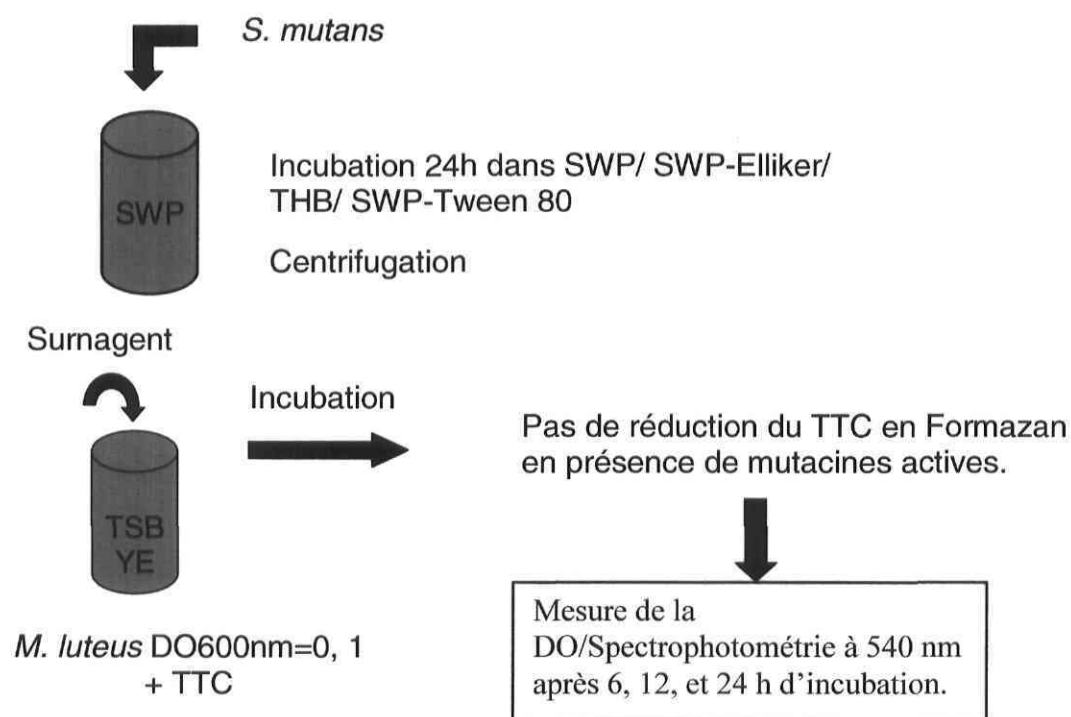
2.3.1.1. Préparation du TTC 0,03%

Nous avons choisi de réaliser cette méthode dans un bouillon TSBYE qui a montré une meilleure croissance des souches productrices. Une bonne croissance des souches augmente la densité cellulaire qui joue dans certains cas un rôle déterminant dans la production de mutacines (Qi et al. 2000, 2001 ; Merrit et al. 2005).

On a additionné 6% de TTC dans 100ml de bouillon TSBYE et on a effectué une filtration stérilisante afin d'éliminer toute contamination possible du TTC (figure 2.2). Un volume de 50 µl du filtrat a ensuite été ajouté dans 10 ml de TSBYE pour former la solution de TTC 0,03% qu'on a évitée d'exposer à la lumière. Le mélange TSBYE-TTC 0,03% a été porté à la densité optique de 0,1 à 600 nm par addition d'une culture de *M. luteus* de 24 h. On a distribué ensuite 100 µl de cette suspension de la souche sensible dans une plaque de 96 puits. Les surnageants (100 µl) de culture de 24 h de chaque souche de *S. mutans* ont été dilués dans la suspension de *M. luteus* contenue dans les puits selon le principe de dilution sérielle. Une partie des surnageants a subi une dilution dans du milieu stérile avant d'être ajoutée sur la plaque.

Le Triton X-100 (1%), un inhibiteur de la croissance de *M. luteus* a été utilisé comme contrôle négatif, et le contrôle positif était constitué par le milieu de culture stérile. La plaque a été incubée et on a effectué la lecture des résultats après 6, 12 et 24 h d'incubation.

Figure 2.2 : Réduction du chlorure de Triphényl tétrazolium (TTC)



SWP : Perméat de lactosérum 6%+Extrait de levure 2%+CaCO₃ 1%;

THB: Todd Hewitt Broth; **TSBYE**: Trypsic Soy Broth-Extrait de levure

SWP-Elliker : Mélange de perméat de lactosérum+bouillon Elliker broth (1:1 v/v)

SWP-Tween 80 : Mélange de perméat de lactosérum+Tween 80 à 1%.

2.3.2. Induction de la production de mutacine par co-culture

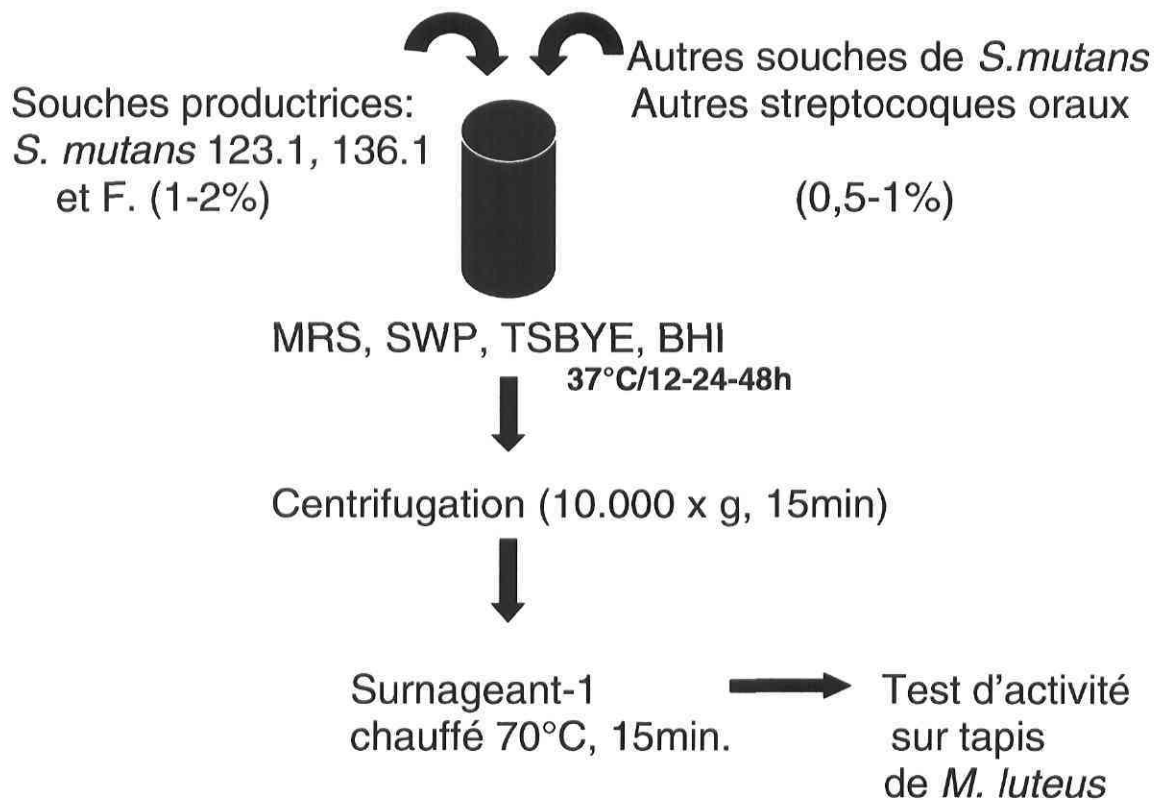
2.3.2.1. Co-culture avec d'autres souches de *S. mutans*, *M. luteus* et d'autres Streptocoques oraux

Un volume d'inoculum (1-2%) des souches productrices a été ajouté dans différents milieux (SWP, TSBYE, BHI, MRS) contenant 0,5-1% d'inoculum d'autres souches de *S. mutans*, d'autres streptocoques oraux (tableau 2.2) disponibles au laboratoire et de la souche sensible. Les milieux ont ensuite été incubés à 37°C et après 12, 24, 48 h le test d'activité sur tapis de *M. luteus* est effectué avec les surnageants recueillis (figure 2.3).

2.3.2.2. Induction de la production de mutacine par les surnageants actifs

C'est une variante de la technique de co-culture qui consiste cette fois à stimuler la production de mutacine par les souches productrices (1-2%) inoculées dans des milieux, par addition d'un surnageant potentiellement actif (2-5%) issu d'une co-culture précédente (Maldonado et al. 2003). Le nouveau surnageant est prélevé et servira aussi d'inducteur pour la production suivante, ainsi de suite jusqu'au niveau souhaité (figure 2.4). A chaque étape de co-culture, le surnageant obtenu est chauffé à 70°C pendant 15 min avant d'être déposé sur un tapis de *M. luteus* pour le test d'activité.

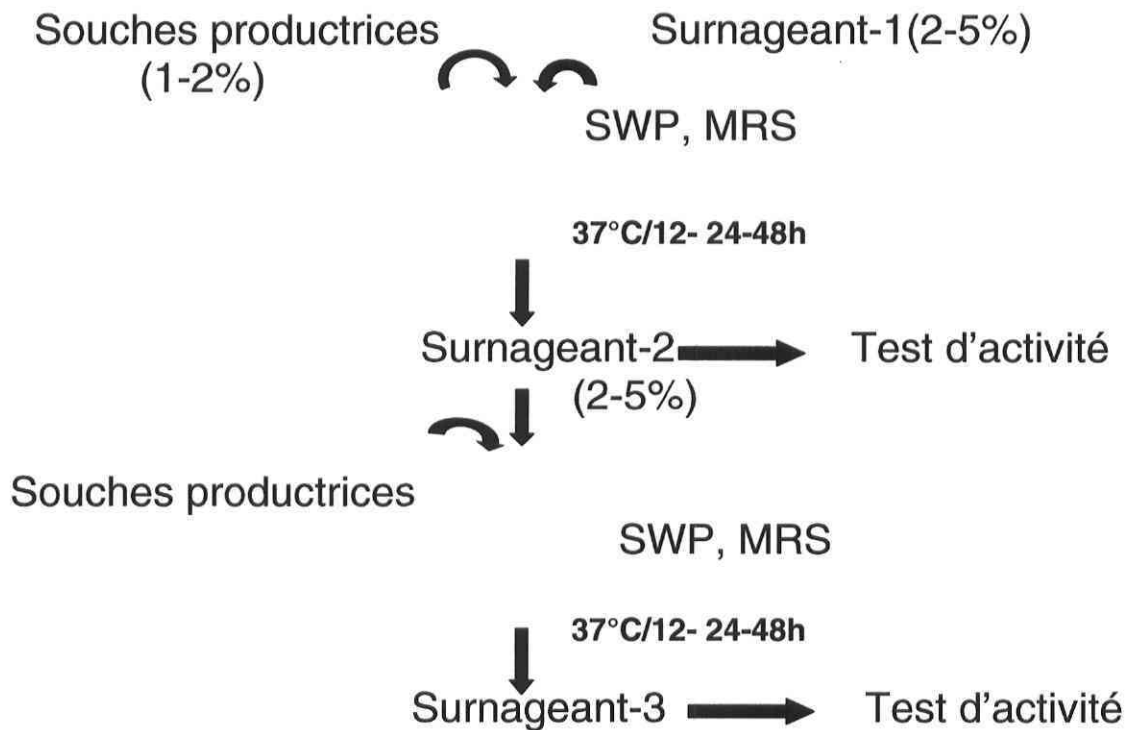
Figure 2.3 : Induction de la production de mutacine par co-culture



MRS : Man-Rogosa Sharp ; **SWP** : Perméat de lactosérum+Extrait de levure+CaCO₃ ;

TSBYE : Extrait tryptique de soja et extrait de levure ; **BHI** : Brain Hart Infusion

Figure 2.4 : Induction de la production de mutacine par des surnageants actifs



SWP : Perméat de lactosérum+Extrait de levure+CaCO₃

MRS : Man-Rogosa Sharp.

2.3.3. Effet du volume d'inoculum sur la production de mutacine

Nous avonsensemencé des milieux frais de perméat (SWP) et de MRS (en culture pure) avec un volume d'inoculum croissant de chaque souche productrice de *Streptococcus mutans* issu d'une pré-culture de 24 h en bouillon TSBYE. Le volume d'inoculum variait de 100 µl à 1 ml, soit 1 à 10% (v/v) d'inoculum. Les milieux ont été incubés à 37°C pendant 24 à 48 h.

Les surnageants (50 µl) obtenus par centrifugation à 10000 × g pendant 15 min ont été déposés dans des puits creusés sur un tapis de *M. luteus* afin de détecter leur activité. Une partie des surnageants a été chauffée à 70°C pendant 10 min afin d'inactiver les cellules restantes, puis le test d'activité a été réalisé. La durée de chauffage du surnageant a été réduite à 10 min afin de vérifier si le chauffage ne détruit pas la mutacine. Les géloses de *M. luteus* ont ensuite été incubées pendant 24 h, avant de procéder à la lecture des résultats qui consiste à rechercher la présence ou l'absence de zone d'inhibition sur le tapis de *M. luteus*.

2.3.4. Méthodes de purification-concentration

2.3.4.1. Concentration sur résine

Différentes résines disponibles au laboratoire (tableau 2.2) ont été sélectionnées et testées à cause de leur capacité potentielle à adsorber et désorber les mutacines. Les colonnes étaient équilibrées et les résines conditionnées avant usage avec du méthanol

100% + HCl 10mM et de l'eau distillée. Les surnageants étaient ensuite élués à leur tour avant le passage de la phase mobile.

2.3.4.1.1. La phase stationnaire

La phase fixe était constituée de résines de nature distincte. Les résines sont des gels en forme de bille qui portent des groupements ionisables dont la charge est positive pour les résines anioniques et négatives pour les résines cationiques. Les résines hydrophobes portent des groupements hydrophobes. Les mutacines de nature amphiphile, c'est-à-dire à la fois hydrophile et hydrophobe peuvent s'ioniser et interagir avec ces différentes résines.

2.3.4.1.2. La phase mobile

Plusieurs solvants différents ont servi pour l'éluion des mutacines adsorbées aux résines. Ils étaient directement versés dans la colonne après le passage du surnageant de culture, selon un gradient de concentration pré-établi et variant de 10 à 100% pour le méthanol et de 0,1 à 2 M pour les autres tampons. Deux manières d'éluion peuvent être utilisées pour décrocher les mutacines adsorbées aux résines :

- soit on modifiait le pH de la phase mobile de telle sorte que les mutacines et les groupements chargés ne le soient plus ; il n'y avait donc plus d'interaction électrostatique entre eux et les mutacines étaient éluées.
- Soit on ajoutait un sel à concentration croissante qui apportait un contre-ion, ion de même charge que les mutacines fixées aux résines.

**Tableau 2.2 : Résines et tampons utilisés pour la concentration
des mutacines**

Résine	Nature	Tampon d'éluion
C18	Hydrophobe	Gradient. MeOH
Carboxyméthylcellulose	Cationique faible	Grad. MeOH; NaCl; KCl
DEAE	Anionique faible	Grad. MeOH; NaCl
Séphadex agarose G25	Cationique faible	Grad. MeOH; KCl
Acétate de cellulose	Gel de filtration	Grad. MeOH; KCl
Alumine	Gel de filtration	Grad. MeOH; KCl
Hydroxyapatite	Anionique forte	MeOH; Phosphate pH 6,8; KCl 0,1 à 2 M.

N.B : **MeOH** : méthanol; **DEAE** : diéthyl amino éthyl cellulose;

Grad. : Gradient; **KCl**: chlorure de potassium; **NaCl**: chlorure de sodium.

Toutes les colonnes ont été conditionnées avec du méthanol 100% et de l'eau distillée.

2.3.4.2. Filtration de fractions sur membrane

La filtration sur membrane permet de purifier l'échantillon de mutacine et de le concentrer, ce qui pourrait augmenter son activité.

2.3.4.2.1. Membranes Centricon[®] YM-10

Ces membranes possèdent une porosité égale à 10 kDa. Si le poids moléculaire des mutacines recherchées est inférieur à 10 kDa, elles pourraient donc se retrouver dans le filtrat.

Les membranes Centricon[®] YM-10 consistent en un tube dont la partie inférieure est séparée de la partie supérieure par une membrane. Une fraction de la culture contenant les protéines est déposée dans la partie supérieure du tube, et repose sur la membrane ; le tube est alors centrifugé à basse vitesse pour forcer le liquide et les petites molécules à traverser cette dernière sous le coup de la gravité. Les protéines trop grosses restent alors dans la partie supérieure. On récupère alors le filtrat qu'on dépose (10 ou 50 μ l) sur un tapis de *M. luteus* en vu de réaliser le test d'activité.

2.4. Production et détection des mutacines à partir de milieu solide

L'activité des mutacines sur gélose se caractérise par l'apparition d'une zone d'inhibition assez large ; nous avons donc tenté d'extraire cette activité à l'aide de solutions d'extraction afin de vérifier si l'activité pouvait se conserver lorsqu'on liquéfiait le fragment de gélose. Nous avons également inséré des substances solides dans nos milieux de culture liquide afin de favoriser l'adsorption des bactéries et stimuler la sécrétion de mutacines comme cela pourrait se produire au niveau de la bouche où les souches productrices adhèrent sur la paroi des dents.

Test d'antagonisme différé

Décrit antérieurement par Morency et al. (1995) et Parrot et al. (1990a, 1990b, 1989), le test d'antagonisme différé consiste àensemencer par piqûre des géloses TSAYE contenant 1,5% d'agar avec des pré-cultures de 24 h des souches productrices en bouillon TSBYE et incubées pendant 48 h. Ensuite, 200 µl d'une culture de *Micrococcus luteus* ATCC 272, souche sensible, sont ajustés par ajout de milieu frais à la densité optique de 0,1 à 600 nm avec un spectrophotomètre. La culture ajustée est alors ajoutée dans 5 ml de gélose molle contenant 0,75% d'agar. Les colonies en croissance des souches productrices *S. mutans* étaient donc recouvertes avec la gélose molle contenant la souche sensible et les géloses étaient à nouveau incubées pendant 24 h. En cas d'apparition de zones d'inhibition, on mesurait le rayon d'inhibition.

2.4.1. Incorporation de billes de verre et de silice dans les milieux

de culture

La production de mutacine au niveau de la flore buccale pourrait être associée à la présence de plusieurs autres facteurs en plus des souches bactériennes antagonistes. Parmi eux, on peut citer les dents, surfaces solides que les souches de *Streptococcus mutans* colonisent préférentiellement et qui pourrait jouer un rôle important.

Des substances solides sont ajoutées dans nos milieux de culture afin de vérifier leur impact sur la production. Des petites billes de verre et de silice (3-5g) ont donc respectivement été rajoutées dans les milieux de culture pour permettre aux bactéries de s'attacher et ainsi de mieux recréer l'environnement in vivo. Après 24 et 48 h d'incubation, le surnageant était retiré, testé sur tapis de *M. luteus*, alors que les billes étaient rincées avec des tampons d'extraction (Tween, NaCl, alcool-acide) pour décrocher les mutacines produites ; le surnageant issu de ce lavage était à nouveau testé.

2.4.2. Extraction de l'activité des mutacines par des solvants

2.4.2.1. Extraction d'un fluide par gel et dégel

Un tapis de croissance de *S. mutans* de 48 h d'incubation sur gélose TSAYE peut être gelé et dégelé successivement afin d'en extraire un fluide comme l'ont démontré Balakrishnan et al. (2000) ainsi que Hillman et al. (1998). Le fluide extrait peut être filtré

sur membranes Millipore (0,45 et 0,22 μm) afin d'exclure les cellules s'y retrouvant ou soumis à une centrifugation préalable à $10\,000 \times g$ pendant 10 min. Si les mutacines sécrétées se retrouvent dans ce fluide, on devrait retrouver facilement leur activité sur un tapis de *M. luteus* après 24h d'incubation.

2.4.2.2. Extraction par l'éthanol

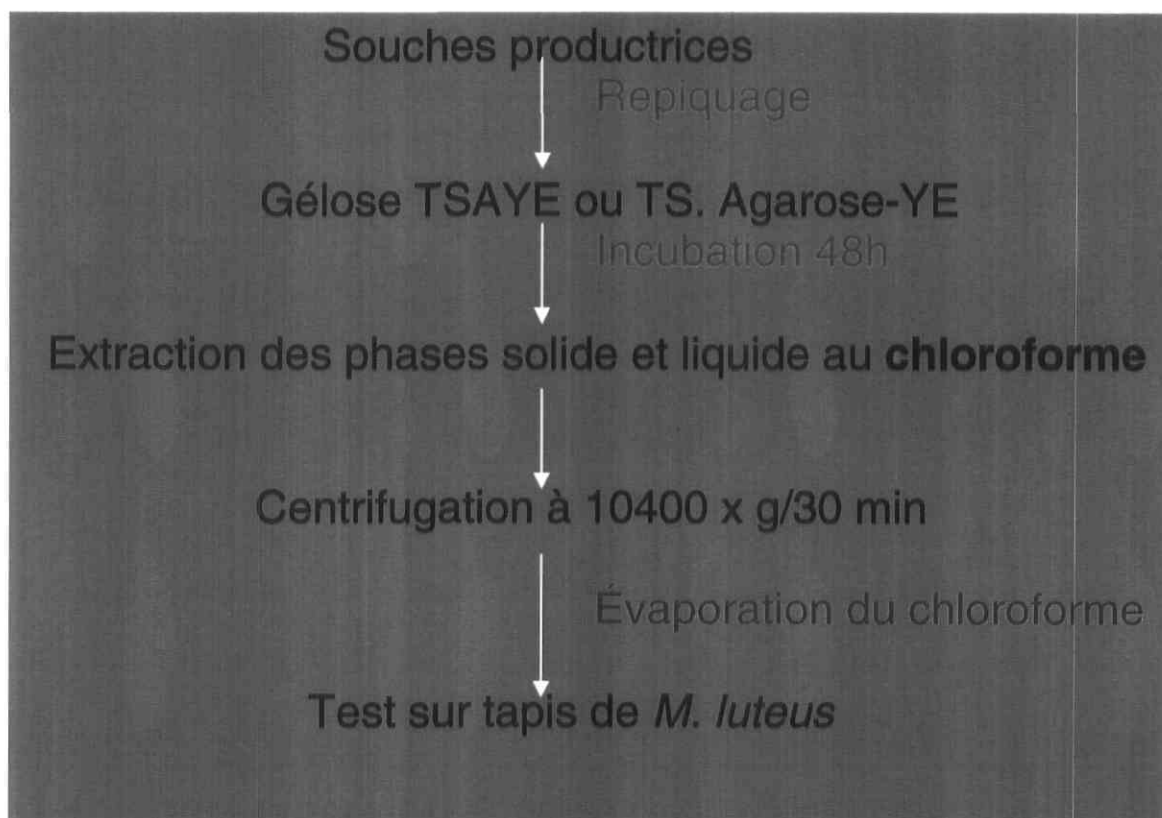
Comparé à d'autres méthodes conventionnelles d'isolement de protéines, l'extraction par l'éthanol permet une économie d'énergie ainsi qu'une diminution de la dénaturation des protéines provoquée par l'action de la chaleur lors du recouvrement du solvant (Zhang et Liu, 2005). C'est une méthode facile et rapide qui a consisté à recouvrir des tapis de croissance des trois souches productrices avec 5 ml d'éthanol 70% à pH 2 et de laisser reposer le tout pendant 5 à 10 min pour permettre au solvant d'extraire les mutacines produites diffusant dans la gélose. Le fluide récupéré dans des tubes eppendorfs d'un 1 ml, a été centrifugé pendant 15 min à $10\,000 \times g$ avant d'effectuer le test d'activité. Une fraction du surnageant a été chauffée pendant 10 min à 70°C avant le test d'activité afin d'inactiver les protéases subsistant dans le surnageant et les cellules productrices pouvant s'y trouver. Une gélose stérile ainsi qu'un tapis de *M. luteus* ont également été recouverts d'éthanol sous les mêmes conditions afin de servir de contrôle.

2.4.2.3. Extraction au chloroforme

Cette méthode découle du test d'antagonisme différé, mais dans ce cas les zones d'inhibition obtenues après incubation ont été récupérées en forme de « carotte », de façon stérile et transférées dans des tubes contenant quelques ml de chloroforme sous une hotte (figure 2.5). Les tubes ont ensuite été centrifugés pendant 30 min à $10\,000 \times g$ à l'aide d'une centrifugeuse Sorvall RC2-B (SRV, Du Pont Company, Instrument Systems Division, Connecticut 06852, USA).

En plus de permettre l'obtention de fragments de protéine de pureté élevée (Oleg et al. 2004), l'extraction au chloroforme a également l'avantage de concentrer et séparer le surnageant par précipitation en trois phases : une phase aqueuse, une phase riche en chloroforme, et une phase intermédiaire visqueuse dans laquelle on devrait retrouver les mutacines extraites. On a ensuite procédé à l'évaporation du chloroforme par chauffage du surnageant à 70°C pendant 15 min, avant de tester le surnageant de chaque phase car le chloroforme peut inhiber la croissance de la souche sensible *M. luteus*. Le culot obtenu après centrifugation a été lavé avec des solutions tampons (NaCl, Tween) puis centrifugé ; le surnageant a également été utilisé pour effectuer le test d'activité. La même expérience a été effectuée avec une gélose modifiée contenant de l'agarose 1,5% à la place de l'agar afin de tester l'influence de l'agar sur la diffusion des mutacines.

Figure 2.5 : Étapes de l'extraction au chloroforme



TSAYE : Extrait tryptique de soja-Agar-Extrait de levure

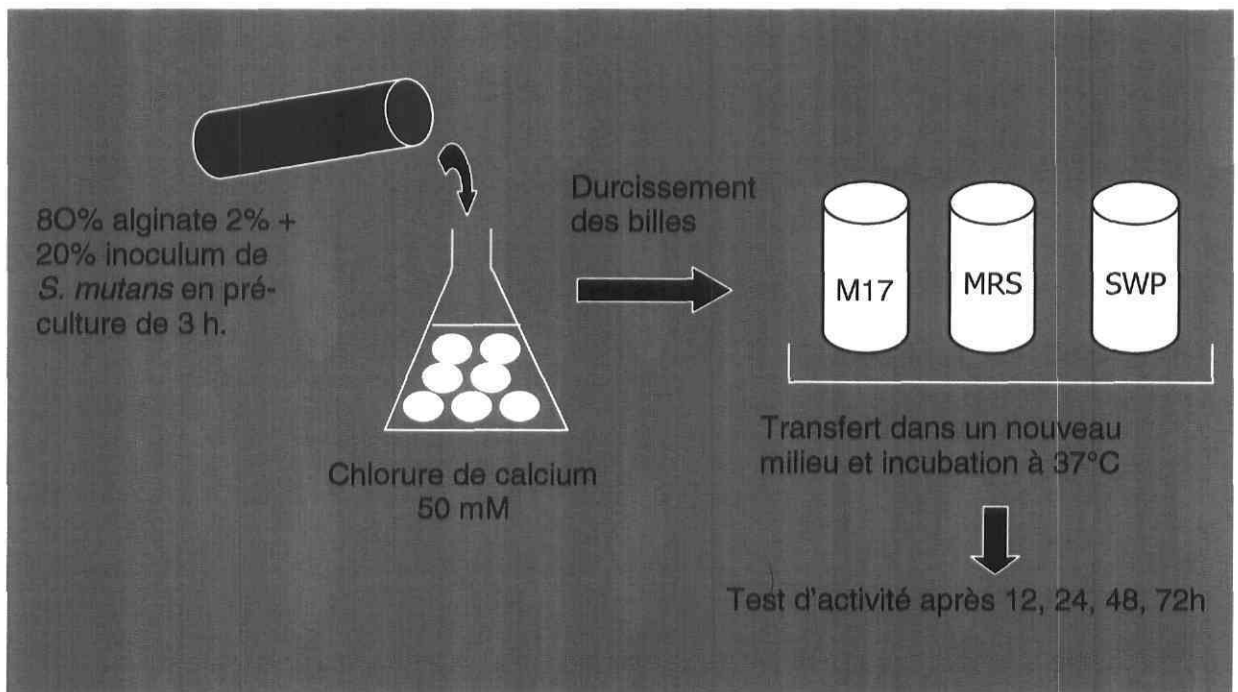
TS. Agarose-YE : Extrait tryptique de soja-Agarose-Extrait de levure

2.4.3. Production par immobilisation de cellules dans des billes d'alginate

Des études antérieures ont rapporté une production notable de bactériocines par la technique des cellules immobilisées (Audet et Lacroix, 1989 ; Wan et Coventry, 1997).

Le principe de la méthode consiste à « emprisonner » séparément 20% d'un inoculum des trois souches productrices à l'intérieur de billes d'alginate dans différents milieux de culture à pH 4,5 comme le montre la figure 2.6, avant de les incuber sous agitation. Le volume d'inoculum élevé (20%) est justifié par le désir de charger les billes en biomasse. Des prélèvements des cultures fermentées sont effectués et les échantillons sont centrifugés à 10 000 x g pendant 15 min afin de tester l'activité des surnageants respectifs. Une fraction des surnageants a été filtrée sur membrane millipore de 0,45 puis 0,22 μm à cause de la viscosité du surnageant. Les billes d'alginate ont elles mêmes été testées après broyage et extraction avec divers tampons (Tween, alcool-acide, NaCl), afin de récupérer les mutacines actives retenues dans les billes.

Figure 2.6 : Immobilisation de cellules dans des billes d'alginate



M17 : Milieu complexe à base d'extrait de viande ; **MRS** : Man-Rogosa Sharp ;

SWP : Perméat de lactosérum+Extrait de levure+CaCO₃.

2.4.4. Détection de mutacines par migration sur gel électrophorétique

2. 4.4.1. Préparation et migration du gel « overlay »

On a préparé un gel dénaturant de polyacrylamide 15% sur lequel on a déposé respectivement dans chaque puit 50, 100, et 150 µl de nos échantillons. Les échantillons déposés étaient des surnageants issus de nos trois souches après 24 h d'incubation en milieu SWP et des surnageants issus de l'expérience sur l'immobilisation des cellules dans les billes d'alginate en milieu SWP. Une migration « over-night » à 48 mA a été réalisée, et les échantillons testés ont été dupliqués.

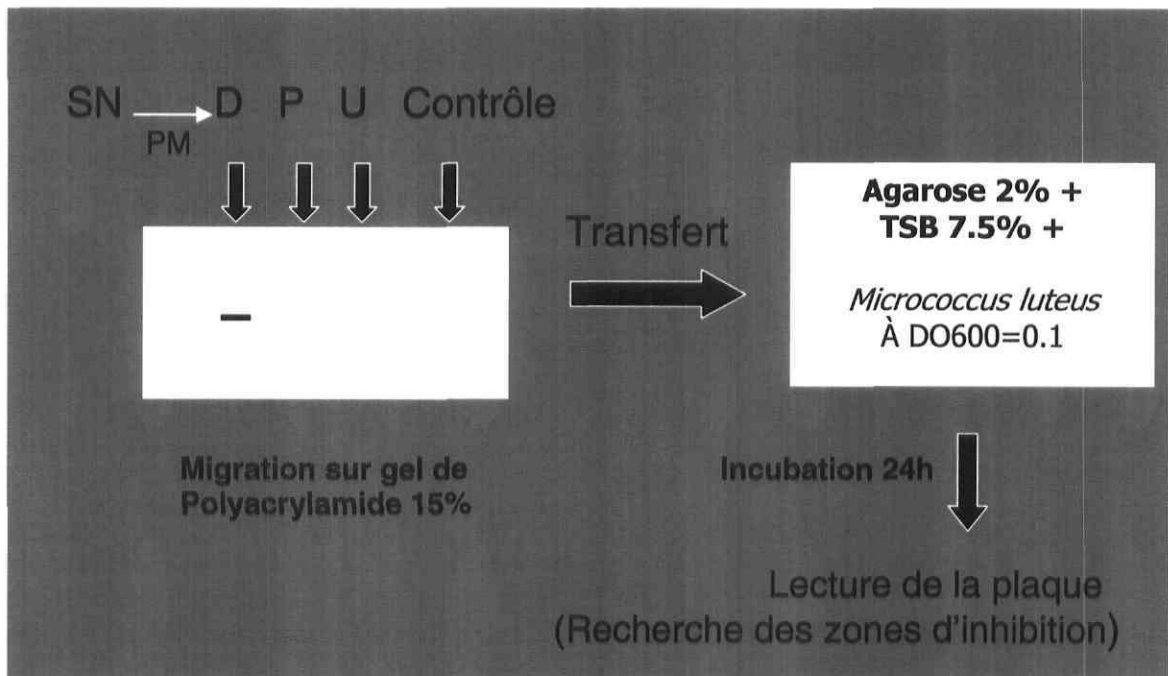
Après la migration, le premier gel a été coloré au bleu de Coomassie et une décoloration « over-night » a été réalisée avec un mélange contenant 10% d'acide acétique et 20% de méthanol. Il a servi de témoin, c'est-à-dire que si une activité de mutacine était détectée sur la plaque d'agarose suite à la superposition du second gel, la bande identifiée pouvait directement être récupérée sur le gel témoin au vu de poursuivre les étapes subséquentes. Le second gel a été plongé dans une solution de phosphate de sodium 10 mM pendant 30 min avant sa superposition sur une plaque d'agarose 2%.

2.4.4.2. Test d'activité par superposition du gel de polyacrylamide

Un gel d'agarose 2% et de TSB 7,5% a été préparé séparément puis refroidi dans un mélange à base de sodium phosphate et de NaCl pH 7,4. Le gel d'agarose a ensuite été recouvert d'une culture de la souche sensible *M. luteus* portée à une densité optique de 0,1 à 600 nm.

Le second gel de polyacrylamide contenant les bandes des différents peptides après leur migration électrophorétique, a été transféré sur le gel d'agarose contenant la souche sensible par superposition (figure 2.7). L'ensemble a alors été incubé pendant 3 h, avant d'être retiré et recouvert d'une solution nutritive composée d'agarose 1% et de TSB 6%. On a replacé les gels superposés dans l'incubateur pendant 24 h. En cas d'activité des mutacines, des zones d'inhibition étaient visibles sur le gel d'agarose. Et dans ce cas, on identifiait la bande active et son correspondant sur le premier gel de polyacrylamide servant de contrôle. La bande pouvait ainsi être récupérée et séquencée directement à partir de ce gel. Tel est le double avantage de cette technique.

Figure 2.7 : Méthode de migration sur gel « overlay »



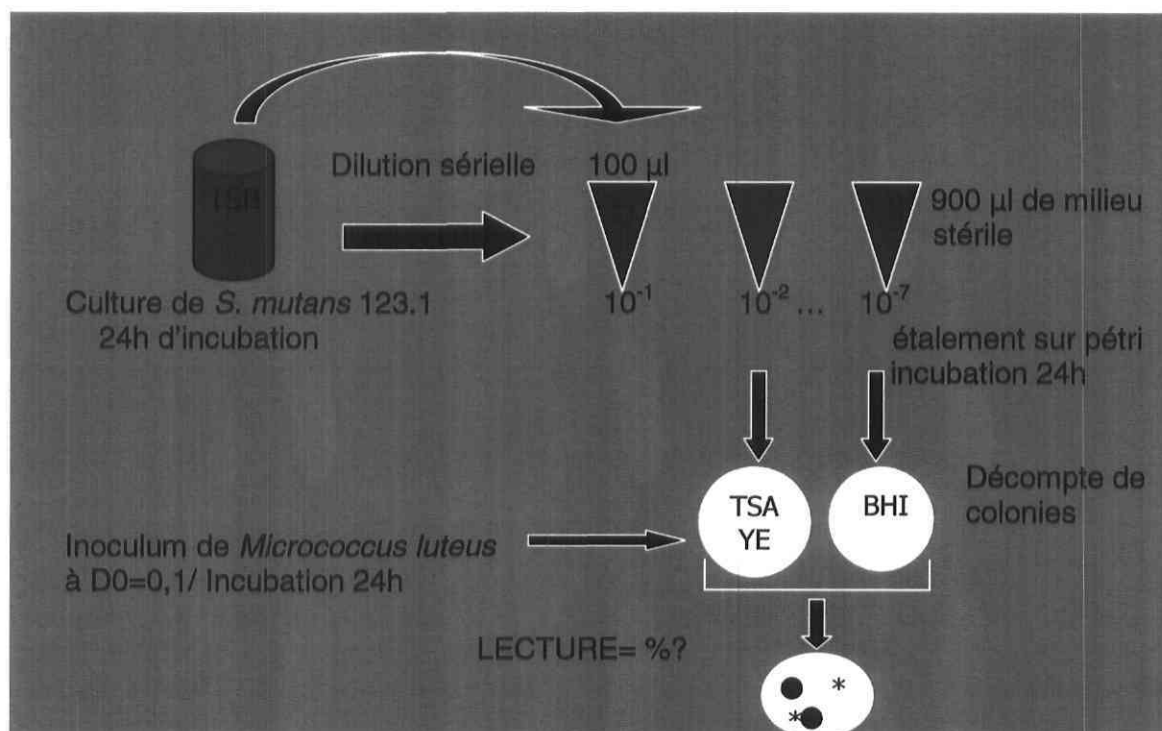
SN : surnageant issu d'une culture de : **D** : *S. mutans* 123.1, **P** : *S. mutans* 136.1 et **U** : *S. mutans* F

PM : échelle poids moléculaire

2.4.5. Méthode de détection de lacune ou « Lacuna assay »

Pour des raisons de temps, nous avons choisi de réaliser le test « Lacuna » uniquement avec la souche de *Streptococcus mutans* 123.1. Le but de cette expérience était de déterminer si tous les clones de *S. mutans* produisaient des mutacines sur milieu solide (Razool et Ahmad, 2003). Pour cela, on réalise une dilution sérielle jusqu'à 10^{-7} (figure 2.8) de la souche issue d'un bouillon TSBYE de 24 h (100 μ l) dans des tubes eppendorfs contenant 900 μ l de milieu TSBYE stérile. Le volume total des tubes est donc 1ml. Les dilutions 10^{-5} à 10^{-7} sont étalées sur des géloses TSAYE et BHI qui sont ensuite incubées pendant 24 h. Un premier décompte de clones a été effectué après 24 h puis les géloses ont été recouvertes avec un inoculum de la souche sensible *M. luteus* porté à une DO=0,1 à 600 nm, avant d'être incubées à nouveau pendant 24 h. Enfin, le nombre de clones n'ayant pas produit de zones d'inhibition est compté et le pourcentage par rapport au ratio de clones initial est déterminé. Pour toutes les dilutions l'expérience a été réalisée en triplicata et seule la moyenne du nombre de colonies a été retenue.

Figure 2.8 : Méthode « Lacuna assay » avec *S. mutans* 123.1



TSB : Bouillon à base d'extrait tryptique de soja ; **TSAYE** : Extrait tryptique de soja-Agar-Extrait de levure ; **BHI** : Brain Heart Infusion.

% ?: Pourcentage recherché du nombre de clones non producteur de mutacine

2.4.6. Extraction de l'activité des mutacines sur gel fondant à basse température (agarose low melt).

Une autre alternative a consisté à produire les mutacines sur gélose à partir d'un test d'antagonisme modifié par remplacement de l'agar par l'agarose « low melt ». L'agarose « low melt » ou encore agarose fondant à basse température est généralement utilisé pour les gels d'ADN. Additionné de tryptic soy broth (3%) et d'extrait de levure (0,3%), elle permet une bonne croissance des trois souches productrices. L'agarose « low melt » présente surtout l'avantage de fondre ou de se liquéfier lorsqu'il est chauffé à 50°C, avant de se solidifier à nouveau.

L'objectif était donc de récupérer les plages de zones d'inhibition sur la gélose après incubation avec la souche sensible, et d'en extraire l'activité par chauffage des fragments d'agarose low melt récupérés. Avant la solidification, 10 µl du surnageant obtenu ont rapidement été déposés sur un tapis de *M. luteus* afin de vérifier si l'activité observée avec la zone d'inhibition était conservée après liquéfaction du fragment d'agarose « low melt ».

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1. Optimisation de la production des mutacines

3.1.1. Influence des facteurs extrinsèques

3.1.1.1. Rôle des sources de carbone

La supplémentation des milieux de culture avec certains sucres comme le sucrose et le galactose ont permis à une concentration de 10%, d'atteindre une croissance rapide et abondante des souches productrices surtout dans le milieu de perméat de lactosérum comparativement aux autres milieux, sans pour autant montrer une production détectable de mutacines. Cependant, aucune courbe de croissance n'a été présentée pour suivre l'évolution des souches dans les milieux concernés.

3.1.1.2. Rôle des ions et du surfactant

Les cations Mg^{2+} , Ca^{2+} , l'acide ascorbique, ainsi que le phosphate (K_2HPO_4) testés dans nos expériences n'ont pas joué un rôle significatif sur la production des trois mutacines d'intérêt, démontrant ainsi que leur effet serait lié à la spécificité de chaque souche. Il en est de même pour le Tween 20 et 80, leur impact sur la production de mutacine n'a pas été déterminant. Aucune production de mutacine n'a été obtenue pour les trois souches.

3.1.2. Conditions de culture

3.1.2.1. Effet de l'agitation

Les tentatives de production de mutacine en condition statique et sous agitation, n'ont pas montré de différences majeures même en ce qui concerne la croissance des souches productrices. La production de mutacine est restée négative dans les deux cas.

3.1.2.2 Conditions anaérobies

La culture en anaérobiose (Coy Anaerobic Chamber 80% N₂ : 5% H₂ : 15% CO₂) a montré une faible croissance des trois souches et aucune production de mutacine n'a été détectée.

3.2. Détection par réduction du TTC

Après quelques heures d'incubation de la plaque de titration, la lecture de l'absorbance (540 nm) est effectuée à l'aide d'un lecteur à microplaque. En principe, la présence de substances bactériolytiques dans le surnageant devrait se manifester par une diminution notable de la densité optique de *M. luteus* initialement porté à 0,1. Par contre l'apparition d'une coloration rougeâtre résultant de la réduction du TTC en formazan par les hydrogénases de la souche sensible en croissance pourrait servir d'indicateur de l'absence de mutacines actives.

Les expériences ont été réalisées en triplicata. Les trois souches productrices ont d'abord été incubées dans du perméat de lactosérum, puis dans 3 milieux différents. Les

résultats les plus significatifs que nous résumons dans le tableau 3.1 ont été obtenus après culture de souches dans des milieux différents. La densité optique de la souche sensible retenue est la moyenne de trois valeurs. Pour chaque expérience, la DO de la souche sensible est de 0,1 au temps 0.

A la lecture du tableau 3.1, une constatation importante peut être dégagée. Après 6 h d'incubation, la DO de la souche sensible est inférieure à la DO du contrôle positif alors qu'elle se rapproche de celle du contrôle négatif surtout pour les souches D-123.1 et P-136.1 (encadré). Des substances inhibitrices semblent présentes, cet effet est renforcé par l'absence de coloration rouge.

Tableau 3.1 : Mesure de la densité optique lors de la réduction du TTC

Milieu/souche	Temps d'incubation		
	6 h	12 h	24 h
SWP-Elliker/ D-123.1	C+= 0,589	1,116	1,418
	C-= 0,020	0,014	0,06
	S= 0,037	0,252	0,815
SWP-Tween80/ P-136.1	C+= 0,270	0,677	1,203
	C-= 0,059	0,036	0,016
	S= 0,098	0,123	0,464
SWP/U-F	C+= 0,133	0,445	1,118
	C-= 0,072	0,047	0,021
	S= 0,094	0,626	1,022

C+ : contrôle positif à base de milieu stérile ; C- : contrôle négatif à base de Triton X-100 ;

S : surnagent de culture ; SWP : perméat de lactosérum.

3.3. Production de mutacine par co-culture

Streptococcus mutans côtoie au niveau de la flore buccale plusieurs autres espèces bactériennes. Nous avons sélectionné quelques unes d'entre elles (Tableau 2.2) afin de créer une compétition dans la colonisation et l'utilisation des métabolites du milieu. Ce conflit entre les différentes souches pourrait stimuler la production de mutacines par *S. mutans* dans le milieu.

Nous avons réussi à obtenir un surnageant légèrement actif par co-culture de la souche D-123.1 avec la souche sensible *M. luteus*. Le test d'activité du surnageant a permis d'observer des zones d'inhibition d'environ 1 cm de diamètre. Il nous a toutefois été difficile de poursuivre la titration de cette activité vu qu'elle était faible et instable. Malgré plusieurs reprises de cette expérience, l'instabilité de l'activité du surnageant s'est confirmé et nous tenterons d'en trouver les raisons plus loin.

Les autres tests de co-culture des souches productrices de mutacine avec d'autres streptocoques n'ont pas montré d'effets détectables sur tapis de *M. luteus*.

3.4. Effet des billes solides sur la production de mutacines

Aucun surnageant prélevé des milieux de culture chargé de billes de verre ou de silice ne s'est montré actif après 24 à 48 h d'incubation. Même le lavage des billes par les solvants n'a pas permis d'observer une activité de mutacines potentiellement accrochées aux billes.

3.5. Extraction des mutacines par les solvants

Les surnageants, obtenus par suspension des zones d'inhibition issues de test d'antagonisme différé, à l'éthanol 70% et au chloroforme, n'ont pas montré d'activité détectable sur un tapis de *M. luteus*.

3.6. Immobilisation des cellules dans des billes d'alginate

La méthode des cellules immobilisées possède un fort potentiel pour augmenter la biomasse et donc la productivité. Cependant, elle ne nous a pas permis d'aboutir à des résultats positifs. En effet, aucun surnageant issu des trois milieux de culture et de l'extraction des billes par les solvants n'a montré une activité détectable de mutacines.

3.7. Détection par superposition du gel de polyacrylamide

Après migration sur gel de polyacrylamide, nous avons obtenus des bandes dont la taille n'était pas suffisante pour permettre la détection de l'activité des mutacines par superposition sur la plaque d'agarose recouverte avec la souche sensible. La quantité de mutacine détectable très faible (avec 1% d'inoculum bactérien) dans les surnageants de culture pourrait en être la cause. Le volume d'inoculum jouerait probablement un rôle crucial.

3.8. Influence du volume d'inoculum sur la production de mutacine

L'augmentation du volume d'inoculum bactérien (de 1 à 10%) et donc de la densité cellulaire, pour un volume de 10 ml de milieu de culture, a permis d'obtenir un résultat positif avec la souche D-123.1 issue d'un milieu de perméat 6% supplémenté à l'extrait de levure après 24 h d'incubation. Les surnageants se sont montrés actifs à pH 4,5 et après entreposage à 4°C pendant 30 min pour un volume d'inoculum de 800 µl et de 1000 µl (1 ml) respectivement (tableau 3.2). Par contre, le chauffage des surnageants à 70°C pendant 10 min abolit totalement l'activité observée. Il se pourrait donc que la mutacine D-123.1 soit sensible à 70°C. Aucune activité n'a cependant été observée suite à l'ajustement des surnageants de culture à pH 2.

Tableau 3.2 : Résultats montrant l'effet du volume d'inoculum sur la production de mutacine dans deux milieux différents.

Souches	10 ml Milieu Perméat /24h	10 ml Milieu MRS /24h
<i>S.mutans</i> 123.1	Positif: 800 µl et 1 ml	Négatif
136.1	Négatif	Négatif
F	Négatif	Négatif

800 µl et 1 ml : volume respectif d'inoculum ajouté au milieu.

3.9. Méthode de détection de lacune ou Lacuna assay

Le test Lacuna, a été réalisé uniquement avec la souche D-123.1 pour tenter d'analyser le comportement des souches productrices. Il a révélé des résultats significatifs. À la lecture du tableau 3.3 qui rapporte l'ensemble des expériences en duplicata (2 séries de dilutions réalisées), on constate que pour des fortes densités bactériennes (dilution 10^{-5}), tous les clones ou une forte majorité produisent les mutacines. Mais lorsque la densité bactérienne est faible (dilution 10^{-7}), le pourcentage de clones non producteurs de mutacine dépasse les 50% et peut atteindre 80%.

Il est cependant utile de remarquer que l'expérience « Lacuna assay » a été reprise par le Dr. Marc Lavoie et son équipe de l'Université de West Indies et les résultats sont totalement en contradiction avec ceux obtenus ici. Ils rapportent que toutes les colonies de *S. mutans* 123.1 produisent une zone d'inhibition sans différence notable entre les dilutions. Ces résultats laissent supposer une possible contamination de la souche du laboratoire de Québec qui devrait donc être vérifiée.

3.10. Extraction de l'activité des mutacines sur gel d'agarose fondant à basse température (gel d'agarose low melt)

Le but de cette méthode consistait à obtenir une production de mutacines sur milieu solide puis d'en extraire l'activité grâce aux propriétés de l'agarose fondant à basse température (low melt). Il est donc possible de restituer l'activité des mutacines après

l'extraction et la solubilisation des fragments de zone d'inhibition par chauffage à 50°C dans un bain-marie.

C'est ainsi que nous avons réussi à conserver l'activité du surnageant actif de la mutacine D-123.1 après solubilisation du gel d'agarose « low melt » comparativement au gel stérile (contrôle) qui n'a montré aucune activité. En effet, on retrouve sur le tapis de *M. luteus* des zones d'inhibition issues du gel liquéfié, mais leur rayon d'inhibition est plus étroit que le rayon de la zone initiale sur l'agarose « low melt ». Afin d'augmenter sa diffusion, nous avons essayé de diluer le gel (1/2) une fois liquéfié avec de l'eau distillée, sans obtenir une meilleure activité.

Tableau 3.3 : Résultats Test Lacuna avec *S. mutans* 123.1

Dilution	Nombre de colonies	Nombre de colonies non-productrices
10^{-5}	147	53 (36%)
10^{-6}	99	60 (66%)
10^{-7}	19	14 (73%)

1^{ère} série

Nombre de colonies	Nombre de colonies non-productrices
450 360	0%
91	55 (62%)
11	9 (80 %)

2^e sérieEn **gras** : Pourcentage de clones non producteurs de mutacine D-123.1

CHAPITRE IV

DISCUSSIONS

4.1. Production et détection des mutacines en milieu liquide

4.1.1. Détection des mutacines par réduction du TTC

Un lecteur à microplaque mesure l'absorbance à 540 nm. Le principe consiste à mesurer le taux de respiration des cellules bactériennes viables. En effet, les cellules vivantes respirent et produisent des hydrogénases qui peuvent réduire le TTC en formazan de couleur rouge. Ainsi, en présence de mutacines actives dans le surnageant de culture, le TTC de couleur naturellement jaunâtre ne pourra être réduit en formazan par les hydrogénases à cause de l'extinction de la souche sensible *Micrococcus luteus*.

La croissance de la souche sensible *M. luteus* semblerait être maîtrisée après 6 et 12 h d'incubation probablement grâce à l'action des mutacines produites. Pour les surnageants de culture des souches 123.1 et 136.1, cette légère activité se poursuit au-delà de 24 h d'incubation car il ya une certaine croissance de la souche sensible mais beaucoup plus faible que le contrôle alors que le surnageant de culture de la souche F est inactif après 6 h d'incubation. Cette activité éphémère de la mutacine U-F pourrait s'expliquer par plusieurs causes notamment l'insuffisance de la production ou l'action des protéases.

En effet, il se peut que les mutacines très faiblement produites dans le surnageant, ne peuvent contenir la croissance de la souche sensible au delà d'un certain temps. D'autre part, des protéases libérée dans le milieu de culture (Perméat-Elliker, perméat-Tween 80) peuvent rapidement dégrader partiellement ou totalement les mutacines secrétées (Ennahar et al. 2000), empêchant ainsi l'inhibition de la croissance de *M. luteus*. Il se pourrait aussi

que des cellules de *Micrococcus luteus* qui ne sont pas tuées à cause de l'insuffisance de mutacine dans le milieu, continuent à se multiplier, ce qui explique la reprise de la croissance de la souche sensible au-delà de 6 h. Cependant, même après 24 h d'incubation, les densités optiques des cultures traitées avec les surnageants de culture des souches 121.3 et 136.1 sont plus faibles que celles des cultures témoins.

4.1.2. Induction de la production de mutacine par co-culture

La technique de co-culture est basée sur l'antagonisme ou la compétition que se livrent des bactéries plus ou moins apparentées pour coloniser une niche écologique. Cette compétition se manifeste par la production par une espèce ou une souche, de substances nuisibles à une autre, notamment les peptides antimicrobiens qui renferment les mutacines.

Le principe de la méthode consiste donc à cultiver la souche productrice en présence d'une autre souche de *S. mutans* ou d'une autre espèce afin d'activer la production de mutacine. Maldonado et al. (2003) ont réussi à stimuler la production de la plantaricine NC8 par *Lactobacillus plantarum* NC8 uniquement en co-culture avec d'autres bactéries à Gram positif. Le meilleur rendement a été obtenu avec *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363 pour un titre de 2560 AU/ml. Par contre, l'induction de la production de la plantaricine NC8 à l'aide de surnageant actif (en absence de la souche inductrice), a été possible mais à un titre plus faible de 640 UA/ml. Cette auto-induction suggère l'existence d'un mécanisme de quorum-sensing qui régule la production de bactériocine par *L. plantarum* NC8.

Deux raisons importantes pourraient justifier l'échec des expériences que nous avons effectuées. Ainsi, il semblerait que la co-culture de bactérie exige une connaissance de la communication cellule-cellule entre les différentes souches ou espèces en culture, phénomène plus connu sous le nom de « quorum sensing ». La connaissance du « quorum sensing » des souches productrices de mutacine ainsi que des espèces bactériennes utilisées nous aurait certainement permis d'affiner la sélection des souches compatibles pour une co-culture et de mieux ajuster les conditions de culture (Wang et al. 2005). Enfin, l'interaction de *S. mutans* avec d'autres bactéries orales pourrait interférer avec la production de mutacine comme le confirme cette même étude (Wang et al. 2005) qui démontre que la production de bactériocine par la souche *S. mutans* GS5 est inhibée de façon plus importante en biofilm que dans un bouillon de culture par *S. gordonii* Challis.

4.1.3. Effet du volume d'inoculum sur la production de mutacine

L'augmentation du volume d'inoculum de 1 à 10% a permis d'accroître la densité cellulaire de *S. mutans* 123.1 en milieu de culture et d'activer la production de la mutacine D-123.1. La densité cellulaire de la souche productrice peut visiblement affecter la production de mutacine *in vitro*. Des travaux antérieurs (Novak et al. 1994, Qi et al. 1999a, 2000, 2001) ont démontré que la production de la mutacine I augmentait fortement avec la densité cellulaire. Merritt et al. (2005) ont prouvé qu'une densité cellulaire élevée renforçait le niveau d'expression du gène de transcription de la mutacine I.

Cependant, les niveaux de production de la mutacine D-123.1 que nous avons obtenu en milieu perméat après 24 h d'incubation restent insuffisants à cause de l'instabilité et de la variabilité de l'activité observée. L'instabilité vient du fait qu'un même surnageant testé actif pouvait ensuite perdre son activité ou la retrouver au cours des tests d'activités suivants. Le problème de variabilité survenait lorsqu'en préparant de nouveaux surnageants dans les mêmes conditions, nous ne parvenions pas toujours à obtenir et conserver une activité constante. Ces deux phénomènes gênent la reproductibilité de l'expérience, ce qui explique par ailleurs pourquoi nous n'avons pas pu titrer l'activité de la mutacine D-123.1. Ils peuvent également se justifier par une quantité de mutacines produites trop faible pour être détectée sur un tapis de *M. luteus*.

Pour stabiliser cette activité, une des pistes à retenir serait d'étudier le rôle des protéases. Il suffirait pour cela d'ajouter un inhibiteur de protéase dans le surnageant actif, puis de tester le surnageant et de voir si son activité se maintient. Aucun inhibiteur n'étant disponible au laboratoire, l'expérience n'a pu être réalisée. Ce test nous aurait également permis de savoir si la mutacine D-123.1 n'est pas un produit issu de l'activité protéolytique des protéases dans le milieu de culture ou sur les cellules productrices comme l'ont décrit certains auteurs avec d'autres bactériocines (Faye et al. 2004, Gomez et al. 2001).

4.1.4. Méthodes de purification-concentration

La purification de bactériocine fait généralement suite à une production suffisante en milieu liquide afin d'éliminer les contaminations éventuelles. En effet, les milieux complexes utilisés pour la culture des souches ou les suppléments utilisés pour optimiser la production (ex. Tween 80) peuvent contenir des quantités de peptides dont le poids moléculaire peut parfois se rapprocher de celui des bactériocines recherchées et peuvent interférer avec l'activité des bactériocines pures (Carolissen-Mackay et al. 1997, Muriana et Klaenhammer. 1991).

La difficulté ou la faiblesse de production de mutacine en milieu liquide nous a obligé à effectuer des étapes de purification et de concentration préliminaires afin d'augmenter les chances de détection. Deux types de concentration basés sur la nature amphiphile des mutacines ont été utilisés: la concentration sur résine et la filtration sur membrane. Toutefois, aucune d'elle n'a permis d'atteindre les buts fixés. En effet, après élution, nous n'avons pas pu retrouver l'activité de la mutacine D-123.1 obtenue avec 10% d'inoculum en milieu perméat comme décrit précédemment (tableau 3.2). Il se pourrait donc que la mutacine éluee se soit adsorbée aux résines et que le passage des tampons d'élution n'ait pas réussi à la décrocher. Par ailleurs, il se peut que le poids moléculaire de la mutacine soit >10 kDa et qu'elle ait été retenue par le filtre, ou que la mutacine se soit adsorbée sur le filtre lui-même. Cette hypothèse s'appuierait sur la théorie selon laquelle la plupart des bactériocines sensibles à 70°C sont des bactériocines supérieures à 10 kDa. Il

aurait fallu également tester le surnageant ainsi que la membrane filtre afin d'avoir une idée plus précise.

4.2. Production et détection des mutacines à partir de milieu solide

La production de mutacine en milieu liquide est très fastidieuse comme l'ont démontré de nombreuses études. Pour contourner cette production insuffisante ou la détection difficile des mutacines *in vitro*, une alternative consisterait à produire et extraire les mutacines à partir de milieux solides. Il a en effet été démontré, grâce au test d'antagonisme différé (Parrot et al. 1989, Morency et al. 1995, Balakrishnan et al. 2002) que l'activité des mutacines était facilement détectable sur gélose d'agar à l'extrait tryptique de soja enrichi à l'extrait de levure (gélose TSA YE). Mais il ne semble pas si facile de l'extraire de la gélose en quantité appréciable.

4.2.1. Effets des billes solides sur la production des mutacines

Des billes de verre et de silice ont été séparément utilisées pour stimuler la production de mutacines après fixation des bactéries. Cependant aucune expérience préliminaire au test d'activité, n'a été réalisée pour confirmer l'adhérence effective des bactéries sur ces billes. Par ailleurs, hormis l'adhésion sur des surfaces solides comme les dents, d'autres facteurs *in vivo* jouent certainement un rôle dans la production de mutacines par *S. mutans*.

4.2.2. Extraction des mutacines par les solvants

L'étape d'extraction des mutacines par l'éthanol, à partir des zones d'inhibition de *M. luteus* obtenues suite au test d'antagonisme différé, n'a été effectué qu'avec de l'éthanol 70% à pH 2. Il aurait peut être été judicieux de réaliser ce test selon un gradient d'éthanol et/ou en combinant l'éthanol avec un autre solvant polaire à différents ratios. En effet, Zhang et Liu (2005) ont réussi à isoler une protéine concentrée de soja après cinq extractions répétées de 15 min chacune, de matières grasses de soja avec un mélange d'éthanol aqueux-hexane (9:1, v/v) à 45°C.

Oleg et al. (2004) sont parvenus à purifier la sous-unité membranaire « a » d'une ATP synthase d'*Escherichia coli* par extraction à l'aide d'un mélange de solvants polaires chloroforme, méthanol et eau, suivie d'une chromatographie par échange d'ions. Comparativement à notre expérience, les auteurs ont passé leurs surnageants successifs dans des proportions variables du mélange de solvant : chloroforme-méthanol (1:1 v/v ; 2 :1 v/v) et chloroforme-méthanol-eau (4:4:1). Le résidu issu de l'évaporation du mélange a été fractionné à l'acétone avant d'être ressuspendu dans le mélange de solvants additionnés de sels tels que l'éthanoate de sodium et le chlorure de lithium. Les échecs de notre test pourraient donc résulter d'une maîtrise incomplète de cette technique, ou alors d'une quantité de mutacine produite trop faible pour une telle extraction.

4.2.3. Production par immobilisation de cellules dans des billes d'alginate

La production de mutacine peut être améliorée si l'on augmente la biomasse cellulaire du milieu. Audet et Lacroix (1989), ont réussi à produire la bactériocine MJC15 en immobilisant la souche bactérienne *Lactococcus lactis ssp lactis* MJC15 dans des billes de carraghénane 2,75% (p/v) et de gomme de caroube 0,25% (p/v). Plus récemment, Wan et Coventry (1997), ont obtenu une production suffisante de bactériocine par fermentation de la souche productrice dans des billes d'alginate. Lacroix et al. (2004) ont réussi à produire de la nisine, en incorporant 15% de la souche productrice *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 dans des billes d'alginate activées avec du periodate de sodium comparativement à une activité faible obtenue avec des bactéries libres en culture.

La majorité des tests ayant recours à la technique d'immobilisation de cellules dans des billes décrits dans la littérature exige le respect de certains paramètres importants que nous n'avons pu contrôler :

- l'étape d'incubation des billes dans un milieu riche afin de les charger en biomasse ;
- la mesure du chargement effectif des billes en biomasse afin de vérifier l'emprisonnement effectif des bactéries à l'intérieur des billes;
- le renouvellement progressif du milieu de culture qui apporte de nouveaux nutriments nécessaires pour une production continue et suffisante de mutacines ;

- Le maintien d'un pH constant et son contrôle tout au long du processus de fermentation à l'aide d'un contrôleur de pH, non disponible dans notre cas. L'addition du carbonate de calcium dans nos milieux de production nous a permis de stabiliser le pH autour de 5.

Enfin, l'insuffisance de cette méthode pourrait être liée au faible volume d'inoculum des souches productrices. Nous aurions pu tester avec des volumes variant de 20 à 50% et observer l'influence sur la production. On pourrait également se demander si les billes d'alginate sont compatibles à la croissance de nos souches et si elles constituent la matrice idéale pour cette expérience.

4.2.4. Détection de mutacines par migration sur gel électrophorétique

Cole et al. (2002) ont réussi grâce à cette méthode, à identifier et mesurer l'activité antibactérienne d'une douzaine de peptides antimicrobiens à partir du liquide nasal. Schaffner et al (2004) sont également parvenus à visualiser sur gel de recouvrement (gel overlay), deux peptides antibactériens dérivés du PBP (platelet basic protein) exprimé par les monocytes humains. Wang et al. (2005) ont identifié des composants antibactériens du mucus cervical humain dont le HMGN2 (High Mobility Group Chromosomal protein N2) sur gel de recouvrement couplé à une diffusion radiale sur agar.

La migration sur gel de recouvrement est une approche protéomique de choix pour la détection de peptides. Elle revêt un double avantage :

- Elle peut permettre une estimation globale du poids moléculaire du peptide à identifier
- et en cas d'activité, le peptide concerné est récupéré et directement séquencé.

Sauf qu'à cause de la faiblesse du volume d'inoculum utilisé (1%) et par conséquent de la densité cellulaire ou compte tenu du niveau l'insuffisance de mutacines produites, il n'a pas été possible de détecter des bandes suffisantes après migration sur le gel de polyacrylamide. Peut être aurait-il fallu concentrer les surnageants par lyophilisation par exemple avant la migration sur gel. De plus, il aurait été pertinent d'inclure un puits avec de la nisine commerciale comme contrôle positif afin de s'assurer du fonctionnement de cette méthode.

4.2.5. Méthode de détection de lacune ou Lacuna assay

Ozeki et al. (1962) puis Razool et Ahmad (2003) confrontés aux difficultés de production de certaines bactériocines en milieu liquide, ont utilisé cette technique pour trouver la ou les raison(s) principale(s) pouvant justifier ce phénomène.

Le principe de la méthode consiste à dénombrer le taux de bactérie qui ne produit pas de zones d'inhibition sur gélose à partir d'un test d'antagonisme différé modifié. Ainsi, si le pourcentage de ces clones est élevé, il pourrait éventuellement expliquer:

- l'absence ou la difficulté de production de mutacine en milieu liquide ;

- l'insuffisance ou l'instabilité de la production de mutacine pouvant être observée dans certains milieux.

Les résultats obtenus révèlent qu'en milieu solide un fort taux de clones de *S. mutans* ne produit pas de mutacine. On peut faire un lien entre les résultats obtenus sur milieu solide et la production de mutacine en milieu liquide. Hormis l'ampleur des chiffres, ces résultats pourraient confirmer ce que nous redoutions déjà, c'est-à-dire la difficulté ou l'insuffisance de production de mutacine en milieu liquide. Comme ils pourraient tout aussi bien expliquer la variabilité de la production ou l'instabilité de l'activité de la mutacine D-123.1 obtenue en milieu perméat lorsqu'on augmente le volume d'inoculum initial à 10%.

Il semblerait donc qu'une densité cellulaire élevée soit nécessaire à la production de mutacine, ce qui pourrait correspondre à une production contrôlée via un mécanisme de « quorum sensing » (Qi et al. 2006).

4.2.6. Extraction de l'activité des mutacines sur gel d'agarose fondant à basse température (gel d'agarose low melt)

L'extraction sur agarose fondant à basse température a permis d'extraire l'activité de la mutacine D-123.1 après chauffage du gel à 50°C, mais le rendement obtenu est limité comparativement à l'activité observée sur la gélose d'agarose low melt. Le chauffage du gel pourrait expliquer cette baisse d'activité. En effet, la conservation d'un minimum d'activité après chauffage, signifierait que la mutacine D-123.1 serait thermostable à 50°C alors qu'elle serait thermosensible à 70°C comme nous l'avons expliqué au paragraphe 3.6.

On pourrait donc facilement appliquer cette technique pour extraire l'activité des mutacines produites par les deux autres souches *S. mutans* 136.1 et F, ce que nous ne sommes pas parvenus à faire pour raison de disponibilité de l'agarose « low melt ».

CHAPITRE V

5.1. CONCLUSION

Des trois mutacines objet de notre étude, seule les mutacines D-123.1 et P-136.1 ont montré une légère activité par détection après réduction du TTC. L'activité de la mutacine D-123.1 s'est confirmée dans un milieu liquide à base de perméat de lactosérum enrichi d'extrait de levure. Elle a été obtenue avec un inoculum de 10% de la souche productrice *S. mutans* 123.1 contrairement aux autres mutacines produites avec 1% d'inoculum, suggérant d'une part l'importance de la biomasse cellulaire pour la sécrétion de certaines mutacines (Audet et Lacroix, 1989), et, d'autre part l'unicité et la complexité de chaque mutacine qui exige certainement un milieu chimiquement défini. Cette dernière hypothèse est confirmée à nouveau par le fait qu'aucun système de chromatographie utilisé n'a permis de purifier le surnageant actif de la mutacine D-123.1.

A la difficulté de la produire en milieu liquide, nous avons composé avec une instabilité et une variabilité de l'activité de la mutacine D-123.1 qui gênent la reproductibilité des tests. Les tests d'activité sont peut être instables et variables. Ce phénomène dont l'origine n'a pas été identifié, n'a donc pas permis l'optimisation et la caractérisation finale (PM, titration, spectre d'activité) de la mutacine D-123.1 qui ne pouvait s'effectuer dans ces conditions.

Pour contourner les difficultés de production des mutacines en milieu liquide, ainsi que les fluctuations observées, une tentative d'extraction de l'activité des mutacines à partir de milieux solides a été réalisée. C'est ainsi que le gel d'agarose fondant à basse température a permis d'extraire et conserver l'activité de la mutacine D-123.1, malgré l'étroitesse des zones d'inhibition obtenues.

Bien que les objectifs spécifiques du projet, à savoir purifier et caractériser ces trois mutacines, n'aient pu être atteints, nous espérons que les conclusions de celle-ci pourront tout de même servir de données sur l'insuffisance et l'instabilité de la production de mutacines à partir de souches non encore étudiées.

5.2. PERSPECTIVES ET AVENIR

Au regard des résultats obtenus et des observations faites au cours de cette étude, il serait dans un premier temps important de stabiliser l'activité de la mutacine D-123.1 afin de compléter sa caractérisation; et cela passe par l'identification du ou des facteurs causant l'instabilité et la variabilité. Ensuite, il faudra développer un système de purification spécifique aux caractéristiques de cette mutacine et autant que possible adapté avec sa future production à l'échelle industrielle.

Dès études ultérieures devraient se pencher sur la caractérisation des gènes jouant un rôle dans la régulation de la biosynthèse de la mutacine D-123.1 afin de modifier le

profil génétique des souches productrices dans le but d'améliorer et de maintenir la productivité et le rendement de mutacine.

Des techniques de transfert de gène déjà utilisées avec succès dans d'autres domaines, et basées sur l'incorporation de plasmide encodant pour des gènes producteurs ou de transposons plus stables, pourraient s'appliquer à nos souches afin de garantir et d'augmenter leur production de mutacines.

Enfin, la recherche d'un test d'activité plus stable et spécifique pour la détection de faible quantité de mutacine pourrait permettre de résoudre les problèmes d'instabilité et de variabilité évoqués au cours de cette étude.

Références bibliographiques

- Abriouel H., N. Ben Omar, R. Lucas, M. Martinez Canamero et A. Galvez. 2006.** Bacteriocin production, plasmid content and plasmid location of enterocin P structural gene in enterococci isolated from food sources. *Appl. Microbiol. Lett.* 42: 331-337.
- Adjic, D., W. M. McShan, R. E. McLaughlin, G. Savic, J. Chang, M. B. Carson, C. Primeaux, R. Tian, S. Kenton, H. Jia, Y. Qian, S. Li, H. Zhu, F. Najjar, H. Lai, J. White, B. A. Roe et J. J. Ferreti. 2002.** Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 14434-14439.
- Agence de Santé publique du Canada. 2004.** Lignes directrices en matière de biosécurité en laboratoire. 3^{ème} édition.
- Anderssen, E. L., D. Bao Diep, I. F. Nes, V. G. H. Eijsink et J. Nissen-Meyer. 1998.** Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricin EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2269-2272.
- Aspiras, M. B., R. P. Ellen et D. G. Cvitkovitch. 2004.** *ComX* activity of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. *FEMS. Microbiol. Lett.* 238: 167-174.
- Audet, P et C. Lacroix. 1989.** Two-phase dispersion process for the production of biopolymer gel beads: effects of various parameters on bead size and their distribution. *Process Biochem.* 24: 217-226.
- Bailey, F. J et A. Hurst. 1971.** Preparation of a highly active form of nisin from *Streptococcus lactis*. *Can. J. Microbiol.* 17: 61-67.

Balakrishnan, M., R. S. Simmonds, A. Carne et J. R. Tagg. 2000. *Streptococcus mutans* strain N produces a novel low molecular mass non-lantibiotic bacteriocin. FEMS Microbiol. Lett. 183: 165-169.

Balakrishnan, M., R. S. Simmonds, M. Kilian et J. R. Tagg. 2002. Different bacteriocin activities of *Streptococcus mutans* reflect distinct phylogenetic lineages. J. Med. Microbiol. 51: 941-948.

Barcena, J. M. B., F. Sineriz, D. Gonzalez de Llano, A. Rodrigez et J. E. Suarez. 1998. Chemostat production of plantaricin C by *Lactobacillus plantarum* LL441. Appl. Environ. Microbiol. 64: 3512-3514.

Barefoot, S. F et T. R. Klaenhammer. 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 45: 1808-1815.

Barefoot, S. F et T. R. Klaenhammer. 1984. Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. Antimicrob. Agents Chemother. 26: 328-334.

Barry, G. T., D. L. Everhart et M. Graham. 1963. Colicin A. Nature. 198: 211.

Baty, D., F. Pattus, M. Parker, H. Benedetti, M. Frenette, J. P. Bourdineaud, D. Cavard, M. Knibiehler et C. Lazdunski. 1990. Uptake across the cell envelope and insertion into the inner membrane of ion channel-forming colicins in *Escherichia coli*. Biochimie. 72: 123-130.

Bauer, R et L. M. Dicks. 2005. Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. Int. J. Food Microbiol. Rev. 101: 201-216.

Bekal-Si Ali, S., Y. Hurtubise, M. C. Lavoie et G. LaPointe. 2002. Diversity of *Streptococcus mutans* bacteriocins as confirmed by DNA analysis using specific molecular probes. *Gene*. 283: 125-131.

Biswas, S. R., P. Ray, M. C. Johnson et B. Ray. 1991. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1265-1267.

Bondi, M., R. G. Neglia, P. Messi, G. Manicardi et U. Fabio. 1991. *Streptococcus mutans*: classification in bacteriocins-types. *Microbiologica*. 14: 223-228.

Boman, H. G. 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 61-92.

Breukink, E., I. Wiedemann, C. Van Kraaij, O. P. Kuipers, H. Sahl et B. de Kruijff. 1999. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science*. 286: 2361-2364.

Breukink, E et de Kruijff. B. 1999. The lantibiotic nisin, a special case or not ? *Biochim Biophys Acta*. 1462: 223-234.

Burianek, L. L et A. E. Yousef. 2000. Solvent extraction of bacteriocins from liquids cultures. *Lett. Appl. Microbiol.* 31: 193-197.

Cabo, M. L., M. A. Murade, M. P. Gonzalez, J. A. Vasquez et L. Pastoria. 2001. An empirical model for describing the effects of nitrogen sources on nisin production. *Lett. Appl. Microbiol.* 33: 425-429.

Carlissen-Mackay, V., G. Arendse et J. W. Hastings. 1997. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *Int. J. Food Microbiol.* 34: 1-16.

- Caufield P., N. K. Childers, D. N. Allen et J. B. Hansen. 1985.** Distinct bacteriocin groups correlate with different groups of *Streptococcus mutans* plasmids. *Infect. Immun.* 48: 51-56.
- Caufield P., W. G. Shah, K. Hollingshead, M. Parrot et M. C. Lavoie. 1990.** Evidence that mutacin II production is not mediated by a 5.6-Kb plasmid in *Streptococcus mutans*. *Plasmid.* 24: 110-118.
- Cheigh, C. -I., H. -J. Choi, H. Park, S. -B. Kim, M. -C. Kook, T. -S. Kim, J. -K. Hwang et Y. -R. Pyun. 2002.** Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from Kimchi. *J. Biotechnol.* 95: 225-235.
- Chen, P., J. Novak, M. Kirk, S. Barnes, F. Qi et P. W. Caufield. 1998.** Structure-activity study of the lantibiotic mutacin II from *Streptococcus mutans* T8 by a gene replacement strategy. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2335-2340.
- Chen, P., F. Qi, J. Novak et P. W. Caufield. 1999.** The specific genes for lantibiotic mutacin II biosynthesis in *Streptococcus mutans* T8 are clustered and can be transferred en bloc. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1356-1360.
- Chen, Q., J. Hu et X. X. Yun. 2006.** Screening, isolation and identification of nisin resistance determinant gene in strains of *Lactococcus lactis*. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 26: 839-842.
- Chikindas, M. L., J. Novak, A. J. M. Driessen, W. N. Konings, K. M. Schilling et P. W. Caufield. 1995.** Mutacin II, a bactericidal lantibiotic from *Streptococcus mutans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 2656-2660.

- Chinachoti, N., T. Zaima, H. Matsusaki, K. Sonomoto et A. Ishikazi. 1997.** Relationship between nisin Z fermentative production and aeration condition using *Lactococcus lactis* IO-1. J. Fac. Agr. Kyushu U. 43: 437-448.
- Cintas L. M., Casaus P., M. F. Fernandez et P. E. Hernandez. 1998.** Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and Lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. Food Microbiol. 15: 289-298.
- Cole, A. M., H. I. Liao, O. Stuchlik, J. Tilan, J. Pohl et T. Ganz. 2002.** Cationic polypeptides are required for antibacterial activity of human airway fluid. J. Immunol. 169: 6985-6991.
- Crandall, A. D et T. J. Montville. 1998.** Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. Appl. Environ. Microbiol. 64: 231-237.
- Daba, H., S. Pandian, J. F. Gosselin, J. Huang, R. E. Simard et C. Lacroix. 1991.** Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. Appl. Environ. Microbiol. 57: 3450-3455.
- Dagry, M. K. 1996.** Isolement et caractérisation de mutants résistants à la mutacine B-Ny266. Mémoire de maîtrise. Université Laval. 61p.
- Davey, G. P et B. C. Richardson. 1981.** Purification and some Properties of Diplococcin from *Streptococcus cremoris* 346. Appl. Environ. Microbiol. 41: 84-89.
- Delisle, A. L. 1986.** Properties of mutacin b, an antibacterial substance produced by *Streptococcus mutans* strain BHT. Microbios. 46: 21-28.
- Dempster, R. P et J. R. Tagg. 1982.** The production of bacteriocin-like substance by the oral bacterium *Streptococcus salivarius*. Arch. Oral Biol. 27: 151-157.

De Vos, W. M., O. P. Kuipers, J. R. van de Meer et R. J. Siezen. 1995. Maturation pathway of nisin and other lantibiotics: post-translationally modified antimicrobial peptides exported by Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 17: 427-437.

De Vuyst, L et J. Vandamme. 1994. Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and application. 151-221 In L. De Vuyst and E. J. Vandamme (eds.), *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and applications*. Blackie Academic and Professional. London, UK.

Dimarcq J.-L et J. A. Hoffman. 2001. Peptides antimicrobiens: les antibiotiques du futur? *Biofutur.* 212: 21.

Dodd, H. M., N. Horn, S. Swindell et M. J. Gasson. 1991. Nisin biosynthesis genes are encoded by a novel conjugative transposon. *Mol. Gen. Genet.* 228: 129-135.

Dodd, H. M., N. Horn et M. J. Gasson. 1990. Analysis of the genetic determinants for the production of the peptide antibiotic nisin. *J. Gen. Microbiol.* 136: 555-556.

Duffes, F., P. Jenoe et P. Boyaval. 2000. Use of two-dimensional electrophoresis to study differential protein expression in divercin V41-resistant and wild-type strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4318-4324.

Ennahar S., D. Aoude-Werner, O. Sorokine, A. Van Dorselaer, F. Bringel, J.-C. Hubert et C. Hasselmann. 1996. Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE92 isolated from cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4381-4387.

Ennahar, S., N. Deschamps et J. Richard. 2000. Natural variation in susceptibility of *Listeria* strains to class IIa bacteriocins. *Curr. Microbiol.* 41: 1-4.

Engelke, G., Z. Gutowski-Eckel, M. Hammelmann et K. D. Entian. 1994. Regulation of nisin biosynthesis and immunity in *Lactococcus lactis* 6F3. Appl. Environ. Microbiol. 60: 814-825.

Fabio, U., M. Bondi, G. Manicardi, P. Messi et R. Neglia. 1987. Production of bacteriocin-like substances by human oral streptococci. Microbiologica. 10: 363-370.

Faye, T., D. A. Brede, T. Langsrud, I. F. Nes et H. Holo. 2004. Prevalence of the genes encoding propionicin T1 and protease-activated antimicrobial peptide and their expression in classical propionibacteria. Appl. Environ. Microbiol. 70: 2240-2244.

Ferretti, J. J., D. Ajdic et W. M. McShan. 2004. Comparative genomics of streptococcal species. Indian J. Med. Res. 119: 1-6.

Fikes, J. D., B. L. Crabtree et B. D. Barridge. 1983. Studies of the mode of action of a bacteriocin produced by *Bacillus stearothermophilus*. Can. J. Microbiol. 29: 1576-1582.

Flores, S. H et R. M. Alegre. 2001. Nisin production from *Lactococcus lactis* ATCC 7962 using supplemented whey permeate. Biotechnol. Appl. Biochem. 34: 103-107.

Franker, C. K. 1980. Mutational loss of sensibility to mutacin GS-5 in *Streptococcus pyogenes*: characterization of a mutant deficient in receptor protein. Antimicrob. Agent Chemother. 17: 151-156.

Fukushima, H., S. Fukushima, T. Umemoto, H. Fukuhara et H. Sagawa. 1982. Purification and chemical analysis of a bacteriocin from the oral bacterium *Streptococcus mutans* Rm-10. Archs Oral Biol. 27: 721-727.

Fukushima H., J. Kelstrup, S. Fukushima, T. Umemoto et H. Sagawa. 1983. Isolation, partial preliminary characterisation of a bacteriocin from *Streptococcus mutans* Rm-10. Antonie Van Leeuwenhoek. 49: 41-50.

- Fukushima H., J. Kelstrup, S. Fukushima, T. Umemoto, A. Kaibori et H. Sagawa. 1985.** Characterisation and mode of action of a purified bacteriocin from the oral bacterium *Streptococcus mutans* Rm-10. *Archs Oral Biol.* 30: 229-234.
- Gao, F. H., T. Abee et W. N. Konings. 1991.** The mechanism of action of the peptide antibiotic nisin in liposomes and cytochrome C oxydase proteoliposomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2164-2170.
- Garriga, M., M. Hugas, T. Aymerich et J. M. Monfort. 1993.** Bacteriocinogenic activity of lactobacilli from fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 142-148.
- Gomez, H. F., I. Herrera-Insua, M. M. Siddiqui, V. A. Diaz-Gonzalez, E. Caceres, D. S. Newburg et T. G. Cleary. 2001.** Protective role of human lactoferrin against invasion of *Shigella flexneri* M90T. *Adv. Exp. Med. Biol.* 501: 457-467.
- González, B., P. Arca, B. Mayo et J. E. Suárez. 1994.** Detection, purification and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2158-2163.
- Gratia, A. 1925.** Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre souches de colibacille. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales.* 93: 1040-1041.
- Gratia, A et P. Fredericq. 1946.** Diversité des souches antibiotiques d'*Escherichia coli* et étendue variable de leur champ d'action. *Compt. Rendu.* 140: 1032-1033.
- Gravesen, A., K. Sørensen, F. M. Aarestrup et S. Knøchel. 2001.** Spontaneous nisin-resistant *Listeria monocytogenes* mutants with increased expression of a putative penicillin-binding protein and their sensitivity to various antibiotics. *Microb. Drug Resist.* 7:127-135.

Gravesen, A., M. Ramnath, K. B. Rechinger, N. Andersen, L. Jansch, Y. Hechard, J. W. Hastings et S. Knochel. 2002. High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology*. 148: 2361-2369.

Goulhen F., Meghrous J et C. Lacroix. 1998. Characterisation of nisin-resistant variants of *Pediococcus acidilactici* UL5. *J. Appl. Microbiol.* 85: 387-397.

Guerra, N. P et L. Pastrana. 2001. Enhanced nisin and pediocin production on whey supplemented with different nitrogen sources. *Biotechnol. Lett.* 23: 609-612.

Guinane, C. M., P. D. Cotter, C. Hill et R. P. Ross. 2006. Spontaneous resistance in *Lactococcus lactis* IL1403 to the lantibiotic lacticin 3147. *FEMS Microbiol. Lett.* 260: 77-83.

McGuire, J. 1995. Bactericidal surfaces and articles with attached bacteriocins. *J. Food Science*. 62: 143-415.

Guyonnet, D., C. Fremaux, Y. Cenatiempo et J. M. Berjeaud. 2000. Method for rapid purification of class IIa bacteriocins and comparison of their activities. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1744-1748.

Hamada, S., H. Imanishi et T. Ooshima. 1986. Isolation and mode of action of a cell-free bacteriocin (mutacin) from serotype g *Streptococcus mutans* MT3791. *Zentralbl. Bakteriologie, Mikrobiol. Hyg. (A)*. 261: 287-298.

Hamada, S et T. Ooshima. 1975a. Inhibitory spectrum of a bacteriocin-like substance (mutacin) produced by some strains of *Streptococcus mutans*. *J. Dent. Res.* 54: 140-145.

Hamada, S et T. Ooshima. 1975b. Production and properties of bacteriocins (mutacins) from *Streptococcus mutans*. *Archs. Oral Biol.* 20: 641-648.

- Hamon, Y et Y. Peron. 1963.** Quelques remarques sur les bactériocines produites par les microbes Gram-positif. C. R. Académie des Sciences de Paris. 257: 1191-1193.
- Hamon, Y. 1965.** Bacteriocins and analogous substances. Pathol. Biol. 13: 806-824.
- Hancock, R. E. W. 1997.** Peptides antibiotics. Lancet 349: 418-422.
- Hancock, R. E. W et D. S. Chapple. 1999.** Peptide antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 1317-1323.
- Hanlin, R. T. 1992.** Index to genera and species of ascomycetes described by A. P. Viegas. Mycotaxon. 43: 207-230.
- Hastings, J. W., M. Sailer, K. Johnson, K. L. Roy, J. C. Vederas et M. E. Stiles. 1991.** Characterization of leuocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. J. Bacteriol. 173: 7491-7500.
- Héchar, Y et H. G. Sahl. 2002.** Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from gram-positive bacteria. Biochimie. Rev. 84: 545-557.
- Heng, N. C., N. L. Ragland, P. M. Swe, H. J. Baird, M. A. Inglis , J. R. Tagg et R. W. Jack. 2006.** Dysgalactin: a novel, plasmid-encoded antimicrobial protein (bacteriocin) produced by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. equisimilis. Microbiology. 152: 1991-2001.
- Heng, N. C et J. R. Tagg. 2006.** What's in a name? Class distinction for bacteriocins. Nature Reviews Microbiol. 4: 1-2.
- Herranz, C et A. J. Driessen. 2005.** Sec-mediated secretion of bacteriocin enterocin P by *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 71: 1959-1963.

Hillman, J. D., K. P. Johnson et B. I. Yaphe. 1984. Isolation of a *Streptococcus mutans* strain producing a novel bacteriocin. *Infect. Immun.* 44: 141-144.

Hillman, J. D et S. S. Socransky. 1987. Replacement therapy for the prevention of dental disease. *Adv. Dent. Res.* 1: 119-125.

Hillman, J. D., J. Novak, E. Sagura, J. A. Gutierrez, T. A. Brooks, P. J. Crowley, M. Hess, A. Azizi, K.-P. Leung, D. Cvitkovitch et A. S. Bleiweis. 1998. Genetic and biochemical analysis of mutacin 1140, a lantibiotic from *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 66: 2743-2749.

Hillman, J. D., T. Brooks, S. M. Michalek, C. C. Harmon et J. L. Snoep. 2000. Construction and characterisation of an effector strain of *Streptococcus mutans* for replacement therapy of dental caries. *J. Dent. Res.* 68: 543-549.

Hillman J. D. 2002. Genetically modified *Streptococcus mutans* for the prevention of dental caries. *Antonie van Leeuwenhoek.* 82: 361-366.

Hirasawa, M., T. Ikeda, T. Koulourides, T. Kurita et T. Housch. 1985. Anti-dental caries effect in rats and man of a bacteriocin purified from the oral bacterium *Streptococcus mutans* C3603. *Arch Oral Biol.* 30: 381-384.

Hirsch A., E. Grinsted, H. R. Chapman et A. T. R. Mattick. 1951. A note on the inhibition of an anaerobic sporeformer in Swiss-type cheese by a nisin producing *Streptococcus*. *J. Dairy Res.* 18: 198-204.

Holck, A., L. Axelsson, S.-E. Birkeland, T. Aukrust et H. Blom. 1992. Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J. Gen. Microbiol.* 138: 2715-2720.

- Holo, H., T. Aymerich, L. S. Havarstein, M. Huga, M. Garriga et I. F. Nes. 1996.** Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1676-1682.
- Huben, K. J. A., E. Y. Wuytack, C. F. Soontjens et C. W. Michiels. 1996.** High pressure transient sensitization of *Escherichia coli* to lysozyme and nisin by disruption of outer membrane permeability. *J. Food. Prot.* 59: 350-359.
- Huot, E., C. Barrena-Gonzalez et H. Petitdemange. 1996.** Tween 80 effects on bacteriocin synthesis by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* J46. *Lett. Appl. Microbiol.* 22: 307-310.
- Ikeda, T., T. Iwanami, M. Hirasawa, C. Watanabe, J. R. McGhee et T. Shiota. 1982.** Purification and certain properties of a bacteriocin from *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 35: 861-868.
- Ikeda, T., T. Koulourides, T. Kurita, T. Housch et M. Hirasawa. 1985.** Anti-dental caries effect in rats and man of a bacteriocin purified from the oral bacterium *Streptococcus mutans* C3603. *Archs Oral Biol.* 30: 381-384.
- Jack, R., J. R. Tagg et B. Ray. 1995.** Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59: 171-200.
- Jack, R. W et G. Jung. 1998.** Natural peptides with antimicrobial activity. *Chimia.* 52: 48-55.
- Jacob, F., A. Lwoff, A. Sminovitch et E. L. Wollman. 1953.** Définition de quelques termes relatifs à la lysogénie. *Annales de l'Institut Pasteur.* 84: 222-224.

- Jarvis, B et J. Farr. 1971.** Partial purification, specificity and mechanism of action of the nisin-inactivating enzyme from *Bacillus cereus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 227: 232-240.
- Joosten, H. M. J et M. Nunez. 1995.** Adsorption of nisin and enterocin 4 to polypropylene and glass surface and its prevention by Tween 80. *Lett. Appl. Microbiol.* 21: 389-392.
- Kamiya, R. U., M. H. Napimoga, R. T. Rosa, J. F. Hofling et R. B. Goncalves. 2005.** Mutacin production in *Streptococcus mutans* genotypes isolated from caries-affected and caries-free individuals. *Oral. Microbiol. Immunol.* 20: 20-24.
- Kanatani, K., M. Oshimura et K. Sano. 1995.** Isolation and characterization of acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1061-1067.
- Kashket, E. R. 1987.** Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS. Microbiol. Rev.* 46: 233-239.
- Kelstrup, J et R. J. Gibbons. 1969.** Bacteriocins from human and rodent streptococci. *Archs. Oral Biol.* 14: 251-258.
- Kelstrup, J et T. D. Funder-Nielsen. 1977.** Synthesis of bacteriocins in liquid cultures of *Streptococcus mutans*. *J. Biol. Buccale.* 5: 99-106.
- Khetsuriani, Sh. G., B. Kh. Rachvelishvili et K. G. Khetsuriani. 2006.** Prevalence of polyresistance to antibiotics among *Helicobacter pylori* strains isolated from patients with gastroduodenal zone diseases. *Ter Arkh.* 78: 19-21.
- Kim, W. S., R. J. Hall et N. W. Dunn. 1997.** The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 449-453.

Kitamura, K., N. Masuda, K. Kato, S. Sobue et S. Hamada. 1989. Effect of a bacteriocin-producing strain of *Streptococcus sobrinus* on infection and establishment of *Streptococcus mutans* on tooth surfaces on rats. *Oral Microbiol Immunol.* 4: 65-70.

Klaenhammer T. R. 1998. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.* 70: 337-349.

Klein, C et K. D. Entian. 1994. Genes involved in self-protection against the lantibiotic subtilin produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2793-2801.

Kleinberg, I. 1982. Dental caries. Dans: W. A. Nolte (ed.), *Oral Microbiol. The C. V. Mosby Company, St Louis, Mo.* P : 605-624.

Kordel, M et H. G. Sahl. 1986. Susceptibility of bacterial, eucaryotic, and artificial membranes to the disruptive action of the cationic peptides pep 5 and nisin. *FEMS Microbiol. Lett.* 34: 139-144.

Krull R. E., P. Chen, J. Novak, M. Kirk, S. Barnes, J. Baker, N. R. Krishna et P. W. Caufield. 2000. Biochemical structural analysis of the lantibiotic mutacin II. *J. Biol. Chem.* 275: 15845-15850.

Kuipers, O. P., M. M. Beerthuyzen, J. R. Siezen et W. M. De vos. 1993. Characterization of the nisin gene cluster *nis* ABTCIPR of *Lactococcus lactis* requirement of expression of the *nis* A and *nis* I genes for development of immunity. *Eur. J. Biochem.* 216: 281-291.

Kuipers, O. P., M. M. Beerthuyzen, P. G. G. A. Deruyter, E. J. Luesink et W. M. De Vos. 1995. Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal-transduction. *J. Biol. Chem.* 270: 27299-27304.

Kuramitsu, H. K. 1993. Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 4: 159-176.

Kurita T et M. Hirasawa. 1988. Biological and biochemical characterisation of a novel lipid-like antibacterial substances (mutalipocines) produced by *Streptococcus mutans* strain 32K. *J. Gen. Microbiol.* 134: 213-220.

Lachance, M. 2000. Purification et caractérisation d'une bactériocine produite par *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* MJC15. Département des sciences des aliments et de nutrition. Université Laval, Qc.

Larsen, A. G et B. Nørrung. 1993. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. *Lett. Appl. Microbiol.* 17:132-134.

Lavoie, M. C., M. Mota-Meira et H. Morency. 2005. In vivo activity of mutacin B-Ny266. *J. Antimicrob. Chemother.* 56: 869-871.

Leer, R. J., J. M. B. M. van der Vossen, M. van Giezen, J. M. van Noort et P. H. Pouwels. 1995. Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiology.* 141: 1629-1635.

Le-Tien, C., M. Millette, M. Lacroix et M. A. Mateescu. 2004. Modified alginate matrices for the immobilization of bioactive agents. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 39: 189-198.

Lewus, C. B et T. J. Montville. 1992. Further characterization of bacteriocins plantaricin BN, bavaricin MN and pediocin A. *Food Biotechnol.* 6: 153-174.

Li, J., M. L. Chikindas, R. D. Ludescher et T. J. Montville. 2002. Temperature- and surfactant-induced membrane modifications that alter *Listeria monocytogenes* nisin sensitivity by different mechanisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5904-5910.

Li, C., J. Bai, W. Li, Z. Cai et F. Ouyang. 2001. Optimisation of conditions for bacteriocin extraction in PEG/salt aqueous two-phase systems using statistical experimental designs. *Biotechnol. Prog.* 17: 366-368.

Liu, W et N. J. Hansen. 1990. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2551-2558.

Loesche, W. J. 1986. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol. Rev.* 50: 353-380.

Longo, P. L., R. O. Mattos-Graner et M. P. A. Mayer. 2003. Determination of mutacin activity and detection of *mutA* genes in *Streptococcus mutans* genotypes from caries-free and caries-active children. *Oral Microbiol. Immunol.* 18: 144-149.

Loyola-Rodriguez, J.P., I. Morisaki, K. Kitamura et S. Hamada. 1992. Purification and properties of extracellular mutacin, a bacteriocin from *Streptococcus sobrinus*. *J. Gen. Microbiol.* 138: 269-274.

Lozano, J., G. Ghanem, B. Loir, M. Hadley, Z. Abdel Malek, A. Libert, V. Del Marmol, F. Lejeune et J. C. Garcia-Borrón. 1992. Partial characterization of IR-alpha-MSH peptides found in melanoma tumors. *Peptides.* 13: 989-994.

Lyon, W. J et B. A. Glatz. 1991. Partial purification and characterisation of a bacteriocin produced by *Propionibacterium thoenii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 701-706.

Lüders, T., G. A. Birkemo, G. Fimland, J. Nissen-Meyer et I. F. Nes. 2003. Strong synergy between a eukaryotic antimicrobial peptide and bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1797-1799.

- Maeda, A et M. Nomura. 1996.** Interactions of colicins with bacterial cell. Studies with radioactive colicins. *J. Bacteriol.* 91:685-694.
- Maldonado, A., J. L. Ruiz-Barba et R. Jimenez-Diaz. 2003.** Production of plantaricin NC8 by *Lactobacillus plantarum* NC8 is induced in the presence of different types of gram-positive bacteria. *Arch Microbiol.* 181: 8-16.
- Mantovani, H. C et J. B. Russel. 2001.** Nisin resistance of *Streptococcus bovis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 808-813.
- Mathieu, F., M. Michel et G. Lefebvre. 1993.** Properties of a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* CP5. *Biotechnol Lett.* 15: 587-590.
- Matsusaki, H., N. Endo, K. Sonomoto et A. Ishizaki. 1996.** Lantibiotic nisin Z fermentative production by *Lactococcus lactis* IO-1: relationship between production of the lantibiotic and lactate and cell growth. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45: 36-40.
- Mattick, A. T. R et A. Hirsch. 1947.** Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. *Lancet*, 2: 5-8.
- Mazzota, A. S et T. J. Montville. 1997.** Nisin induces changes in membrane fatty acid composition of *Listeria monocytogenes* nisin-resistant strains at 10°C and 30°C. *Appl. Environ. Microbiol.* 82: 32-38.
- McEntire, J. C., G. M. Carman et T. J. Montville. 2004.** Increased ATPase activity is responsible for acid sensitivity of nisin-resistant *Listeria monocytogenes* ATCC 700302. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2717-2721.
- Merritt, J., J. Kreth, W. Shi et F. Qi. 2005.** *LuxS* controls bacteriocin production in *Streptococcus mutans* through a novel regulatory component. *Mol Microbiol.* 57: 960-969.

Moore J. E., M. D. Barton, I. S. Blair, D. Corcoran, J. S. Dooley, S. Fanning, I. Kempf, A. J. Lastovica, C. J. Lowery, M. Matsuda, D. A. McDowell, A. McMahon, B. C. Millar, J. R. Rao, P. J. Rooney, B. S. Seal, W. J. Snelling et O. Tolba. 2006. The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. *Microbes Infect.* 8: 1955-1966.

Morency, H et M. C. Lavoie. 1991. Effects of dietary carbohydrates on mutacin production and activity. *Microbios.* 67: 35-46.

Morency, H., L. Trahan et M. C. Lavoie. 1995. A preliminary grouping of mutacins. *Can. J. Microbiol.* 41: 826-831.

Morency, H., M. Mota-Meira, G. Lapointe, C. Lacroix et M. C. Lavoie. 2001. Comparison of the activity spectra against pathogens of bacterial strains producing a mutacin or a lantibiotic. *Can. J. Microbiol.* 47: 322-331.

Mota-Meira, M., G. Lapointe, C. Lacroix et M. C. Lavoie. 2000. MICs of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 24-29.

Mulders, J. W. M., I. J. Boerrigter, H. S. Rollema, R. J. Siezen et W. M. Devos. 1991. Identification and characterization of lantibiotic nisin-Z, a natural nisin variant. *Eur. J. Biochem.* 201: 581-584.

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

Muriana, P. M et T. R. Klaenhammer. 1991. Cloning, phenotypic, expression and DNA sequence of the gene for laticin F, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus* spp. *J. Bacteriol.* 173: 1779-1788.

Nascimento J. S., H. Ceotto, S. B. Nascimento, M. Giambiagi-Demarval, K. R. Santos et M. C. Bactos. 2005. Bacteriocins as alternative agents for control of multiresistant staphylococcal strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 42: 215-221.

Nes, I. F., D. B. Diep, L. S. Havarstein, M. B. Brurberg, V. Eisink et H. Holo. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* 70: 113-128.

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

Nettles, C.G et S. F. Barefoot. 1993. Biochemical and genetics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* 56: 338-356.

Nicolas, G., I. Auger, M. Beaudoin, F. Hallé, H. Morency, G. Lapointe et M. C. Lavoie. 2004. Improved methods for mutacin detection and production. *J. Microbiol. Methods.* 59: 351-361.

Nissen-Meyer, J., H. Holo, L. S. Havarstein, K. Sletten et I. F. Nes. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bacteriol.* 174: 5686-5692.

Nomura, M. 1967. Colicins and related bacteriocins. *Ann. Rev. Microbiol.* 21: 257-284.

Novak, J., P. W. Caufield et E. J. Miller. 1994. Isolation and biochemical characterization of a novel lantibiotic mutacin from *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 176: 4316-4320.

Novak, J., M. Kirk, P. W. Caufield, S. Barnes, K. Morisson et J. Baker. 1996.

Detection of modified amino acids in lantibiotic peptide mutacin II by chemical derivatization and electrospray ionization-mass spectroscopic analysis. *Anal. Biochem.* 236: 358-360.

Novak, J., P. Chen, M. Kirk, S. Barnes, M. J. Jablonsky, S. K. Holaday, N. R.

Krishna, J. Baker et P.W. Caufield. 1997. Structure and activity of the lantibiotic mutacin II. Evidence for two domains? *Nat. Biotechnol. Short Rep.* 8: 87.

Oleg, Y. D., K. Altendorf et R. H. Fillingame. 2004. Subunit A of the *E. coli* ATP synthase: reconstitution and high resolution NMR with protein purified in a mixed polarity solvent. *FEBS Lett.* 556:35-38.

O'Sullivan, L., M. P. Ryan, R. P. Ross et C. Hill. 2003. Generation of food-grade lactococcal starters which produce the lantibiotics lacticin 3147 and lacticin 481. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3681-3685.

Oxford, A. E. 1944. Diplococcin, an anti-bacterial protein elaborated by certain milk streptococci. *Biochem J.* 38: 178-182.

Pantev, A., P. Kabadjova, R. Valcheva, S. Danova, X. Dousset, T. Heartle, J. M.

Chobert et I. Ivanova. 2002. Effects of nitrogen sources on bacteriocin production by *Enterococcus faecium* A 2000. *Folia Microbiol.* 47: 659-662.

Papagiani, M. 2003. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnol. Advan.* 21: 465-499.

Parente, E et A. Ricciardi. 1999. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 628-638.

Parrot, M., M. Charest et M. C. Lavoie. 1989. Production of mutacin-like substances by *Streptococcus mutans*. *Can. J. Microbiol.* 35: 366-372.

Parrot, M., P. W. Caufield et M. C. Lavoie. 1990. Preliminary characterization of four bacteriocins of *Streptococcus mutans*. *Can. J. Microbiol.* 36: 123-130.

Perreten, V., F. Schwarz, L. Cresta, M. Boeglin, G. Dasen et M. Teuber. 1997. Antibiotic resistance spread in food. *Nature.* 389: 801-802.

Piard, J. C., P. M. Muriana, M. J. Desmazeaud et T. R. Klaenhammer. 1992. Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 279-284.

Qi, F., P. Chen et P. W. Caufield. 1999a. Purification of mutacin III from group III *Streptococcus mutans* UA787 and genetic analyses of mutacin III biosynthesis genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3880-3887.

Qi, F., P. Chen et P. W. Caufield. 1999b. Functionnal analysis of the promoters in the lantibiotic mutacin II biosynthetic locus in *Streptococcus mutans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 652-658.

Qi, F., P. Chen et P. W. Caufield. 2000a. Purification and biochemical characterization of mutacin I from group I strain of *Streptococcus mutans*, CH43, and genetic analysis of mutacin I biosynthesis genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3221-3229.

Qi, F., P. Chen et P. W. Caufield. 2000b. Comparative studies of peptide antibiotics produced by the oral bacterium *Streptococcus mutans*. *Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 231.

Qi, F., P. Chen et P. W. Caufield. 2001. The group I strain of *Streptococcus mutans*, UA140, produces both the lantibiotic mutacin I and a nonlantibiotic bacteriocin, mutacin IV. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 15-21.

- Qi, F., J. Kreth, J. Merritt et W. Shi. 2005.** Co-ordinated bacteriocin production and competence development : a possible mechanism for taking up DNA from neighbouring species. *Mol. Microbiol.* 57: 392-404.
- Quadri, L. E., M. Kleerebezem, O. P. Kuipers, W. M. De Vos, K. L. Roy, J. C. Vederas, M et E. Stiles. 1997.** Characterization of a locus from *Carnobacterium piscicola* LV17B involved in bacteriocin production and immunity: evidence for global inducer-mediated transcriptional regulation. *J. Bacteriol.* 179: 6163-6171.
- Quivey, R. G., W. L. Kuhnert et K. Kahn. 2000.** Adaptation of oral streptococci to low pH. *Adv. Microb. Physiol.* 42: 239-274.
- Rasool, S. A et S. Ahmad. 2003.** Isolation and biochemical characterization of mutacin VSM43 from human oral *Streptococcus mutans* VSM43. *Pak J. Pharm. Sci.* 16: 4350.
- Reeves, P. 1965.** The bacteriocins. *Bacteriol. Rev.* 29: 24-45.
- Rodriguez, J. M., O. J. Sobrino, W. L. Moreira, L. M. Cintas, M. F. Fernandez, B. Sanz et P. E. Hernandez. 1992.** Sakacin M, a bacteriocin-like substance from *Lactobacillus sake* 148. *Int J. Food Microbiol.* 16: 215-225.
- Ross, C., J. Shi, G. Zhang, H. Wu, F. Blecha et T. Ganz. 1999.** Porcine epithelial beta-defensin 1 is expressed in the dorsal tongue at antimicrobial concentrations. *Infect Immun.* 67: 3121-3127.
- Schved, F., A. Lalazar, Y. Henis et B. J. Juven. 1993.** Purification, partial characterization and plasmid-linkage of pediocin SJ-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 67-77.

Simpson, W. J et J. R. Tagg. 1983. M-Type 57 group A streptococcus bacteriocin. *Can. J. Microbiol.* 29: 1445-1451.

Siegers, K et K. D. Entian. 1995. Genes involved in immunity to the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1082-1089.

Smith, L., C. Zachariah, R. Thirumorthy, J. Rocca, J. Novak, J. D. Hillman et A. S. Edison. 2003. Structure and dynamics of the lantibiotic mutacin 1140. *Biochem.* 42: 10372-10384.

Smith, L., J. Novak, J. Rocca, S. McClung, J. D. Hillman et A. S. Edison. 2000. Covalent structure of mutacine 1140 and a novel method for the rapid identification of antibiotics. *Eur J. Biochem.* 267: 6810-6816.

Steen, M. T., Y. J. Chung et J. N. Hansen. 1991. Characterization of the nisin gene as part of a polycistronic operon in the chromosome of *Lactococcus lactis* ATCC 11454. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1181-1188.

Suarez, A. M., J. I. Azcona, J. M. Rodriguez, B. Sanz et P. E. Hernandez. 1997. One-step purification of nisin A by immunoaffinity chromatography. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4990-4992.

Tagg, J. R., R. W. Jack, N. C. Heng et J. D. Hale. 2005. Identification of *nImTE*, the locus encoding the ABC transport system required for export of nonlantibiotic mutacins in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 187: 5036-5039.

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

Takada, K., T. Ikeda, I. Mitsui et T. Shiota. 1984. Mode of inhibitory action of a bacteriocin produced by *Streptococcus mutans* C3603. *Infect. Immun.* 44: 370-378.

Trautner, B. W., R. A. Hull et R. O. Darouiche. 2005. Colicins prevent colonization of urinary catheters. *J. Antimicrob Chemother.* 56: 413-415.

Twomey, D., R. P. Ross, M. Ryan, B. Meaney et C. Hill. 2002. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie van Leeuwenhoek.* 82: 165-185.

Upreti, G. C. et R. D. Hinsdill. 1975. Production and mode of action of lactocin 27: bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 7: 139-145.

Uteng, M., H. H. Hauge, I. Brondz, J. Nissen-Meyer et G. Fimland. 2002. Rapid two-step procedure for large scale purification of pediocin-like bacteriocins and other cationic antimicrobial peptides from complex culture medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 952-956.

Valdes-Stauber, N et S. Scherer. 1994. Isolation and characterization of Linocin M18, a bacteriocin produced by *Brevibacterium linens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 : 3809-3814.

Van't Hul, J. S et W. R. Gibbons. 1996. Concentration and recovery of the bacteriocin nisin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Biotechnol Appl. Biochem.* 24: 251-256.

Vessoni Penna, T. C., A. F. Jozala, T. R. Gentile, J. R. Adalberto Pessoa et O. Cholewa. 2006. Detection of Nisin Expression by *Lactococcus lactis* using two susceptible bacteria to associate the Effects of Nisin with EDTA. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 129-132: 334-346.

- Wan, J., J. B. Gordon, K. Muirhead, M. W. Hickey et M. J. Coventry. 1997.** Incorporation of nisin in micro-particles of calcium alginate. *Lett Appl. Microbiol.* 24: 153-158.
- Wandersman C. 1998.** Protein and peptide secretion by ABC exporters. *Res. Microbiol. Rev.* 149: 163-170.
- Wang, B. Y et H. K. Kuramitsu. 2005.** Interaction between oral bacteria: inhibition of *Streptococcus mutans* bacteriocin production by *Streptococcus gordonii*. *Appl. Environ Microbiol.* 71: 354-362.
- Wang, X., Y. Liu, B. Xie, X. Shi, J. Zhou et H. Zhang. 2005.** Effect of nisin on the growth of *Staphylococcus aureus* determined by a microcalorimetric method. *Mol. Nutr. Food. Res.* 49: 350-354.
- Wiedemann, I., E. Breukink, C. Van Kraaij, O. P. Kuipers, G. Bierbaum, B. de Kruijff et H. G. Sahl. 2001.** Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J. Biol. Chem.* 276: 1772-1779.
- Wilkins, J. C., A. H. Karen et D. Beighton. 2002.** Analysis of *Streptococcus mutans* proteins modulated by culture under acidic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2382-2390.
- Woodruff, W. A., J. Novak et P. W. Caufield. 1998.** Sequence analysis of *mutA* and *mutM* genes involved in the biosynthesis of the lantibiotic mutacin II in *Streptococcus mutans*. *Gene.* 206: 37-43.
- Yang, R et B. Ray. 1994.** Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* 11: 281-291.

Yang, R., M. C. Johnson et B. Ray. 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3355-3359.

Yeaman, R. M et N. Y. Yount. 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* 55: 27-55.

Zhang, W. N et D. C. Liu. 2005. A new process for preparation of soybean protein concentrate with hexane-aqueous ethanol mixed solvents. *J. AOAC. Int.* 88: 1217-1222.