

Bactériocines - Taxonomie

Les bactériocines contre *Listeria* : une nouvelle famille de protéines ?

Y Héchard¹, D Renault¹, Y Cenatiempo¹, F Letellier²,
A Maftah³, C Jayat³, P Bressolier³, MH Ratinaud³,
R Julien³, Y Fleury⁴, A Delfour⁴

¹ Laboratoire de biologie moléculaire, IBMIG, CNRS URA 1172, 86000 Poitiers;

² Laboratoire de microbiologie appliquée, IUT La Rochelle, 17000 La Rochelle;

³ Institut de biotechnologie, 87000 Limoges;

⁴ Laboratoire de biochimie des protéines, IBMIG, 86000 Poitiers, France

Résumé – Les bactéries lactiques produisent différents composés bactéricides. Parmi ceux-ci les bactériocines sont des protéines possédant un spectre d'inhibition étroit. Certaines d'entre elles inhibent la croissance de *Listeria monocytogenes*, une bactérie pathogène pour l'homme responsable de la listériose. Toutes ces bactériocines présentent des caractéristiques similaires : production par *Pediococcus* ou *Leuconostoc*, faible poids moléculaire (de 2 700 à 4 630 Da), gène codant porté par un plasmide. De plus, la séquence en acides aminés est connue pour trois de ces bactériocines : la leucocine A, la mésentéricine Y105 et la pédiocine PA-1. Ces protéines montrent une homologie de séquence importante. Ce constat nous permet de faire l'hypothèse selon laquelle les bactériocines anti-*Listeria* appartiendraient à une même famille de protéines. Cet article fait le point sur la bibliographie concernant les bactériocines dirigées contre *Listeria*, dans différents domaines d'études et notamment sur leur mode d'action.

bactériocines / *Listeria monocytogenes* / bactériostatique / bactéricide / bactéries lactiques

Summary – **Anti-*Listeria* bacteriocins: a new family of proteins ?** Lactic acid bacteria produce some bactericidal compounds. Among them, the bacteriocins are proteins possessing a narrow spectrum of inhibition. Some of these bacteriocins allow the inhibition of *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen responsible for human listeriosis. These proteins seem to be closely related; they are produced by 2 genera of lactic acid bacteria: *Pediococcus* and *Leuconostoc*, they are small peptides with a molecular weight of 2 700 to 4 630 Da, and their encoding genes are plasmid-linked. Moreover, amino acid sequences are known for 3 of anti-*Listeria* bacteriocins, leucocin A, mesentericin Y105 and pediocin PA-1. These proteins have a strong sequence homology. We could thus put forward the hypothesis that anti-*Listeria* bacteriocin belong to the same family of proteins. We have attempted to sum up the information concerning anti-*Listeria* bacteriocins in different fields, eg their mode of action.

bacteriocin / *Listeria monocytogenes* / bacteriostatic / antibacterial activity / lactic acid bacteria

INTRODUCTION

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis fort longtemps dans les procédés de fermentation alimentaire. Elles participent aux propriétés organoleptiques ainsi qu'à une meilleure conservation du produit. Cette propriété est la conséquence de la production de divers composés bactéricides (Daeschel, 1989; Piard et Demazeaud, 1991), des acides organiques (notamment l'acide lactique) entraînant une forte baisse du pH, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl et les bactériocines.

Ces dernières sont définies comme étant des protéines ou complexes protéiques à activité bactéricide (Tagg *et al*, 1976; Klaenhammer, 1988). Contrairement aux autres composés, le spectre d'action des bactériocines est plutôt étroit, limité aux espèces taxonomiquement proches du producteur. La synthèse d'une protéine d'immunité protège l'organisme contre sa propre bactériocine. Leur classification peut-être divisée en trois groupes :

- les protéines de poids moléculaire important, comme les colicines produites par *E coli* (Konisky, 1982; Pattus *et al*, 1990);
- les lantibiotiques (Jung, 1991) possédant des acides aminés modifiés de type lanthionine (comme la nisine produite par une bactérie lactique et utilisée en agro-alimentaire);
- les protéines ou peptides de bas poids moléculaire, comme la plupart des bactériocines de bactéries lactiques (Klaenhammer, 1988).

Ainsi, certaines bactériocines de bactéries lactiques sont dirigées contre *Listeria monocytogenes*. Cette bactérie Gram positif, phylogénétiquement proche des bactéries lactiques, est l'agent responsable de la listériose (Farber et Peterkin, 1991). Chez l'homme cette maladie peut provo-

quer septicémie et méningite. La principale source de contamination est d'origine alimentaire. Cela est relié à la capacité de développement des *Listeria* à 4 °C, toutefois une pasteurisation correcte entraîne théoriquement sa destruction. Cette bactérie «opportuniste» se développe préférentiellement chez les personnes ayant des défenses immunitaires affaiblies, les personnes âgées, les femmes enceintes et leur fœtus. Après inoculation par voie orale, les bactéries traversent la barrière intestinale. Elles accèdent ainsi au réseau lymphatique puis sanguin où elles sont phagocytées par les macrophages. Les étapes de l'infection cellulaire sont maintenant connues :

- adhésion à la membrane puis entrée dans la cellule par la formation d'une vacuole;
- sortie de la vacuole grâce à la production de listériolysine;
- multiplication dans le cytoplasme;
- mouvement intracellulaire et passage de cellule en cellule (Cossart et Mengaud, 1989; Mengaud, 1990).

Plusieurs bactériocines anti-*Listeria* ont été identifiées. Elles sont produites principalement par les *Pediococcus* et les *Leuconostoc* (Harris *et al*, 1989; Stiles et Hastings, 1991). Certaines de ces protéines sont purifiées, mais seulement 3 d'entre elles ont une séquence en acides aminés connue. Ce sont la leucocine A-UAL 187 produite par un *Leuconostoc gelidum* (Hastings *et al*, 1991), la pédiocine PA-1 produite par un *Pediococcus acidilactici* (Henderson *et al*, 1992) et la mésentéricine Y105 produite par un *Leuconostoc mesenteroides* (Hécharde *et al*, 1992a). De plus, ces 3 protéines possèdent des homologies de séquence très importantes. Nous nous proposons de faire ici une synthèse, concernant les bactériocines anti-*Listeria*, avec la mésentéricine Y105 comme fil conducteur.

ISOLEMENT

Toutes les bactériocines contre *Listeria* caractérisées dans la littérature sont produites par des *Pediococcus* ou des *Leuconostoc* (tableau I), à l'exception de la nisine (Berridge *et al*, 1952; Jung, 1991), un antibiotique produit par un *Lactococcus lactis* et de la sakacine A produite par un *Lactobacillus sake* (Schillinger et Lücke, 1989), dont nous ne parlerons pas.

L'origine des organismes producteurs est très variable, bien qu'il s'agisse pour la plupart de souches retrouvées dans les produits alimentaires. La mésentéricine Y105 a été isolée à partir de lait de chèvre cru du Poitou-Charentes (Hécharde *et al*, 1990; Hécharde *et al*, 1992a). Elle est produite par un *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides* nommé Y105 (Ln *mesenteroides* Y105). Le *Ln gelidum* A-UAL187 provient de viande emballée sous vide du Canada (Hastings et Stiles, 1991) alors que le *Pediococcus acidilactici* PAC1.0 est référencé dans le souchier NRRL n° B-5627 (Gonzalez et Kunka, 1983).

CARACTÉRISATION

Toutes les bactériocines sont sensibles au traitement par des protéases. La perte de leur activité confirme la nature protéique de ces composés anti-*Listeria*.

Elles présentent toutes une très forte résistance au traitement thermique. L'activité anti-*Listeria* n'est pas diminuée de façon détectable après plus de 10 min à 100 °C (1 h dans le cas de la mésentéricine Y105).

Enfin, la stabilité de ces protéines est plus grande à pH acide. Ceci doit leur permettre de résister à la baisse du pH provoquée par la production d'acide lactique.

SPECTRE D'INHIBITION

L'activité antagoniste est testée sur différentes souches bactériennes, incluant des bactéries lactiques et des pathogènes.

Ces bactériocines sont, par définition, actives contre les *Listeria*. La leucocine A (Hastings et Stiles, 1991) et les pédiocines

Tableau I. Comparaison des bactériocines actives contre *Listeria monocytogenes*.

Bactériocine	Origine	PM	Référence
Leucocin A-UAL 187*	<i>Ln gelidum</i>	3930	Hastings <i>et al</i> , 1991
Mésentéricine Y105*	<i>Ln mesenteroides</i>	3666	Hécharde <i>et al</i> , 1992a
Mésentéroïne 5	<i>Ln mesenteroides</i>	4500	Daba <i>et al</i> , 1991
Nisine*	<i>Lc lactis</i>	3354	Berridge <i>et al</i> , 1952
Pédiocine A	<i>P pentosaceus</i>	ND	Daeschel et Klaenhammer, 1985
Pédiocine Ach	<i>P acidilactici</i>	2700	Bhunia <i>et al</i> , 1988
Pédiocine PA-1*	<i>P acidilactici</i>	4629	Henderson <i>et al</i> , 1992
Sakacine A	<i>Lb sake</i>	ND	Schillinger et Lücke, 1989

* Séquence en acides aminés connue.

cines, ont un spectre d'action plus large. Elles inhibent en outre de nombreuses bactéries lactiques. De plus, la pédiocine AcH (Bhunia *et al*, 1988) et la pédiocine A (Daeschel et Klaenhammer, 1985) montrent une activité sur le développement de *Staphylococcus* et *Clostridium*. De même la leucocine A est active contre *Enterococcus faecalis*. A l'inverse, la mésentéricine Y105 (Héchard *et al*, 1992a) et la mésentéricine 5 (Daba *et al*, 1991) semblent avoir une action spécifique contre les *Listeria*.

Ces résultats doivent être modulés par le fait que, pour chacune des bactériocines, l'éventail des souches testées est différent.

PURIFICATION

La pédiocine A et la mésentéricine 5 n'ont pas fait l'objet d'une purification complète. Cependant, après séparation par SDS-PAGE et détection directe de l'activité anti-*Listeria*, la mésentéricine 5 a un poids moléculaire apparent d'environ 4 500 (Daba *et al*, 1991) et la pédiocine AcH de 2 700 (Bhunia *et al*, 1988). Le poids moléculaire de la pédiocine A n'est pas déterminé.

Seules les purifications de la mésentéricine Y105, de la leucocine A et de la pédiocine PA-1, ont abouti au séquençage amino-terminal partiel ou total de ces protéines.

Ainsi, l'analyse du peptide et de ses fragments tryptiques, nous a permis d'obtenir la séquence complète en acides ami-

nés de la mésentéricine Y105. Elle est composée de 36 acides aminés (aa) et la masse moléculaire calculée est de 3681,7 Da (Héchard *et al*, 1992a). La séquence a été comparée à la banque EMBL ainsi qu'à celles des bactériocines connues. Comme il est montré sur la figure 1, la mésentéricine présente une homologie très importante avec la leucocine A-UAL187 (37 aa, 3 930 Da) et la pédiocine PA-1 (44 aa, 4 629 Da) mais pas avec les protéines de la banque EMBL.

MODE D'ACTION

L'étude du mode d'action des bactériocines est limitée principalement aux colicines. Elles se fixent spécifiquement sur des récepteurs de la membrane externe des cellules sensibles et agissent principalement de 2 façons : clivage enzymatique de l'ADN ou de l'ARNr 16S, et formation de canaux voltage-dépendants dans la membrane plasmique (Pattus *et al*, 1990).

La nisine, un lantibiotique, possède un spectre d'action large. Elle affecte le potentiel de membrane, les flux d'ions et inhibe le transport d'acides aminés (Ruhr et Sahl, 1985; Gao *et al*, 1991).

En revanche, très peu d'études ont été rapportées sur le mode d'action des bactériocines (sans acide aminé modifié) de bactéries lactiques. Récemment, il a été montré que la lactococcine A augmentait spécifiquement la perméabilité et diminuait le potentiel de la membrane cible d'un *Lactococcus lactis* (Van Belkum *et al*, 1991). Elle permet en outre, de diminuer l'incorpo-

KYYGNVTCGKHSVVDWGKATTCIINNGAMAWATGGHQGNHCK	PEDIOCINE PA-1
..... :. :	
KYYGNVHCTKSGCSVNWGEAASAGIHRLANGGNF	MESENTERICINE Y105
..... :. :	
KYYGNVHCTKSGCSVNWGEAFSAGVHRLANGGNFW	LEUCOCINE A-UAL 187

Fig 1. Comparaison de séquences des bactériocines à activité anti-*Listeria*.

ration d'acides aminés par le *Lc lactis* ou d'en favoriser l'efflux. Selon les auteurs, cet effet pourrait être transmis *via* une protéine réceptrice associée à la membrane cytoplasmique. La bactériocine de 54 acides aminés produite par un *Lactococcus lactis* (Holo *et al*, 1991), n'a pas été décrite comme inhibant *L monocytogenes*.

Des travaux préliminaires ont été effectués sur le mode d'action des bactériocines anti-*Listeria*. Ainsi, la pédiocine ACh entraîne une fuite d'ion K^+ et de divers composés, due à l'augmentation de la perméabilité membranaire. Elle se fixe à la surface des membranes de cellules sensibles et même de cellules résistantes. Cependant, un traitement permettant d'enlever l'acide lipoteichoïque de la surface membranaire empêche cette fixation. Son effet est bactéricide (Bhunia *et al*, 1991).

La pédiocine PA-1 (Pucci *et al*, 1988) ainsi que la mésentéricine Y105 (Hécharde *et al*, 1992b) ont aussi un effet bactéricide sur *L monocytogenes*. De façon très surprenante, bien que sa séquence en acides aminés soit très proche, il semble que la

leucocine A ait un effet bactériostatique (Hastings et Stiles, 1991).

Nous avons suivi le comportement en coculture du *Ln mesenteroides* Y105, producteur de la mésentéricine Y105, ou du *Ln mesenteroides* Y30 (Bac-) avec *L monocytogenes* E20. Cette étude est abordée par la méthode classique microbiologique (comptage de colonies) et par la cytométrie en flux. Le cytomètre est capable de distinguer les 2 populations uniquement sur le critère de la lumière diffusée (fig 2). Ainsi, il est possible de suivre instantanément la quantité de cellules pour chacune des souches (Hécharde *et al*, 1992b). L'inoculation initiale est très en faveur de *L monocytogenes* (10 fois plus de cellules), après 6 h de coculture, la population du *Ln mesenteroides* Y105 est en excès alors qu'elle est encore plus faible que *L monocytogenes* E20 avec la souche Y30 (Bac-). L'effet bactéricide de la mésentéricine Y105 est confirmé par la méthode microbiologique.

De plus, la cytométrie en flux nous a permis de montrer que la bactériocine

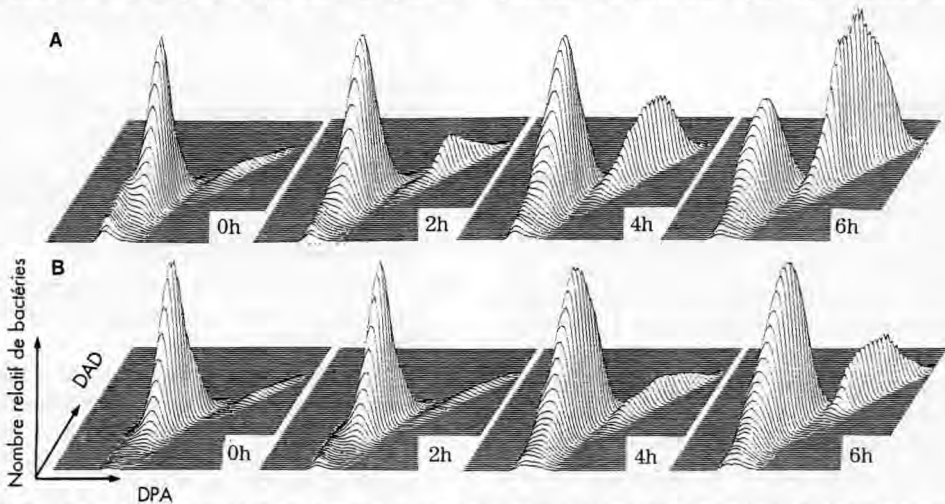


Fig 2. Analyse par cytométrie en flux, en temps réel du comportement en coculture de *Listeria monocytogenes* E20 (population située à gauche dans chaque histogramme) et de *Leuconostoc mesenteroides* Y105 (Bac+) (A) ou Y30 (Bac-) (B). DPA : diffusion de la lumière aux petits angles. DAD : diffusion à angle droit (d'après Hécharde *et al*, 1992b).

avait une action dépolarisante sur la membrane de *L. monocytogenes* E20, par la mesure de la fixation d'une sonde fluorescente spécifique.

L'étude de la mésentéricine Y105 est complétée par des travaux concernant son action sur la respiration ainsi que sur le transport d'acides aminés.

SUPPORT GÉNÉTIQUE

Les bactériocines sont généralement codées par un gène plasmidique. Le gène codant pour la protéine d'immunité, qui permet la protection du producteur, est associé sur un même opéron.

Seule parmi les bactériocines anti-*Listeria*, la leucocine A a une séquence en ADN connue. Les 2 cadres de lecture ouverts sont cernés par un promoteur et un terminateur présumés. Le premier cadre code pour une protéine de 61 aa dont 24 constituent la séquence signal et 37 la bactériocine. Le second code pour 113 aa et pourrait être responsable de l'immunité (Hastings *et al*, 1991).

DISCUSSION

L'étude des bactériocines dirigées contre des souches pathogènes et particulièrement contre *Listeria*, pourrait aboutir à leur utilisation comme agents naturels pour une meilleure conservation des produits alimentaires fermentés. Cette application, en cours avec la nisine, doit être développée par l'apport de nouvelles bactériocines. Une meilleure compréhension de leurs propriétés physiques et chimiques, de leur production et de leur mode d'action est nécessaire afin d'optimiser cette utilisation.

D'un point de vue fondamental, l'émergence d'une nouvelle famille de protéines

à activité anti-*Listeria*, nous conduit à l'étude de leur évolution en comparant les relations structure-fonction des différents variants.

RÉFÉRENCES

- Berridge NJ, Newton GGF, Abraham EP (1952) Purification and nature of nisin. *Biochem J* 52, 529-535
- Bhunia AK, Johnson MC, Ray B (1988) Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J Appl Bacteriol* 65, 61-268
- Bhunia AK, Johnson MC, Ray B, Kalchayanand N (1991) Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. *J Appl Bacteriol* 70, 25-33
- Cossart P, Mengaud J (1989) *Listeria monocytogenes* a model system for the molecular study of intracellular parasitism. *Mol Biol Med* 6, 463-474
- Daba H, Pandian S, Gosselin JF, Simard RE, Huang J, Lacroix C (1991) Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl Environ Microbiol* 57, 3450-3455
- Daeschel MA (1989) Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol* 43, 64-167
- Daeschel MA, Klaenhammer TR (1985) Association of a 13.6-megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity. *Appl Environ Microbiol* 50, 1538-1541
- Farber JM, Peterkin PI (1991) *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev* 55, 476-511
- Gao FH, Abee T, Konings WN (1991) The mechanism of action of the peptide antibiotic nisin in liposomes and cytochrome c oxidase-containing proteoliposomes. *Appl Environ Microbiol* 57, 2164-2170
- Gonzalez CF, Kunka BS (1983) Plasmid transfer in *Pediococcus* spp : intergeneric and intrageneric transfer of pIP501. *Appl Environ Microbiol* 46, 81-89

- Harris LJ, Daeschel MA, Stiles ME, Klaenhammer TR (1989) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* 52, 384-387
- Hastings JW, Stiles ME (1991) Antibiosis of *Leuconostoc gelidum* isolated from meat. *J Appl Bacteriol* 70, 127-134
- Hastings JW, Sailer M, Johnson K, Roy KL, Vederas JC, Stiles ME (1991) Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *J Bacteriol* 173, 7491-7500
- Hécharde Y, Dherbomez M, Cenatiempo Y, Letellier F (1990) Antagonism of lactic acid bacteria from goat's milk against pathogenic strains assessed by the "sandwich method". *Lett Appl Microbiol* 11, 185-188
- Hécharde Y, Dérijard B, Letellier F, Cenatiempo Y (1992a) Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria bacteriocin* from *Leuconostoc mesenteroides*. *J Gen Microbiol* 138, 2725-2731
- Hécharde Y, Jayat C, Letellier F, Julien R, Cenatiempo Y, Ratinaud M-H (1992b) On-line visualization of the competitive behavior of antagonistic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 58, 3784-3786
- Henderson JT, Chopko AL, Van Wassenaar PD (1992) Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. *Arch Biochem Biophys* 295, 1-8
- Holo H, Nilssen O, Nes IF (1991) Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J Bacteriol* 173, 3879-3887
- Jung G (1991) Lantibiotics-ribosomally synthesized biologically active polypeptides containing sulfide bridges and α,β -didehydroamino acids. *Angew Chem* 30, 1051-1068
- Klaenhammer TR (1988) Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70, 337-349
- Konisky J (1982) Colicins and other bacteriocins with established modes of action. *Ann Rev Microbiol* 36, 125-144
- Mengaud J (1990) Etude génétique de la virulence de *Listeria monocytogenes*: rôle de la listeriolytine O et d'autres facteurs de virulence. *Thèse INA Paris-Grignon*
- Pattus F, Massotte D, Wilsem HU, Lakey J, Tsemoglou D, Tucker A, Parker MW (1990) Colicins: prokaryotic killer-pores. *Experientia* 46, 180-192
- Piard JC, Desmazeaud M (1991) Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait* 71, 1-17
- Pucci MJ, Vedamuthu ER, Kunka BS, Vandenberg PA (1988) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0. *Appl Environ Microbiol* 54, 2349-2353
- Ruhr E, Sahl HG (1985) Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles. *Antimicrob Agents Chemother* 27, 841-845
- Schillinger U, Lücke FK (1989) Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl Environ Microbiol* 55, 1901-1906
- Stiles ME, Hastings JW (1991). Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. *Trends Food Sci Technol* 2, 247-251
- Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW (1976). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev* 40, 722-756
- Van Belkum MJ, Kok J, Venema G, Holo H, Nes IF, Konings WN, Abee T (1991) The bacteriocin Lactococcin A specifically increases permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independent, protein-mediated manner. *J Bacteriol* 173, 7934-7941