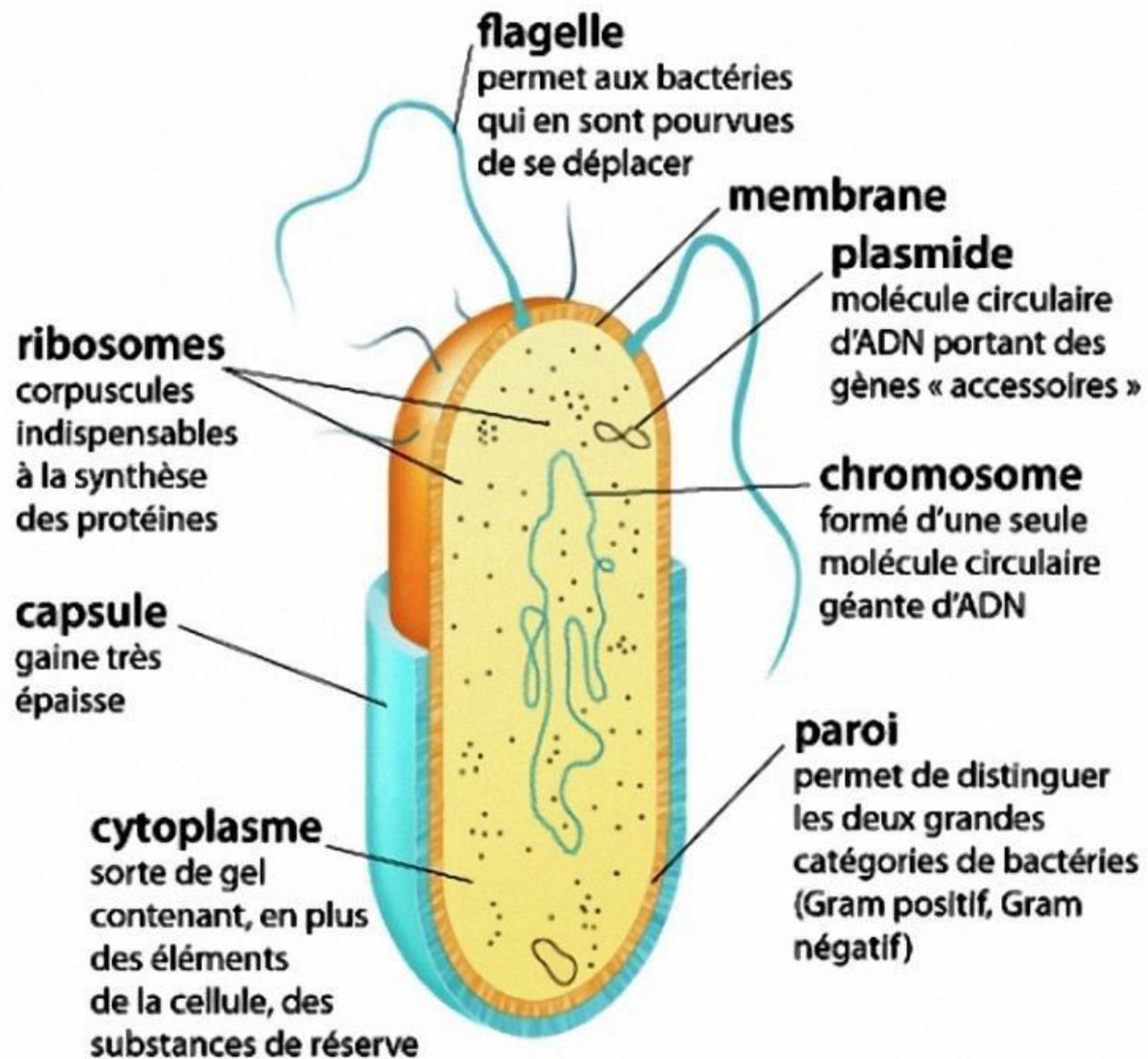


Chapitre 1

Cellule Procaryote : Structure et Métabolisme

1) Introduction

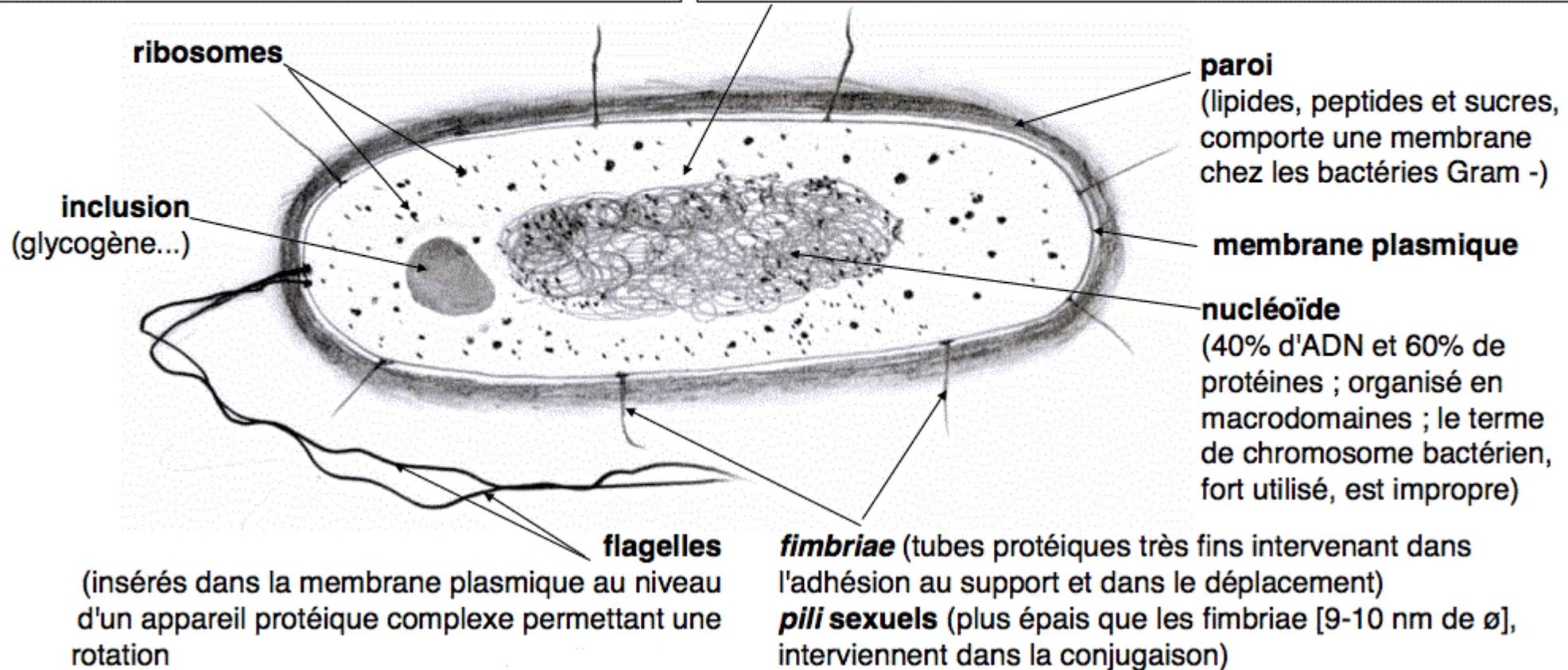
Rappels sur la structure de la cellule bactérienne

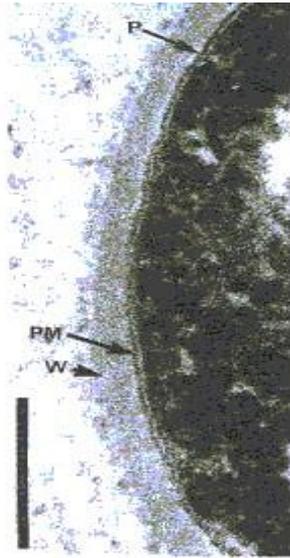


Ultrastructure d'une cellule procaryote (MET x 50.000 - L ~ 2 à 6 μm)

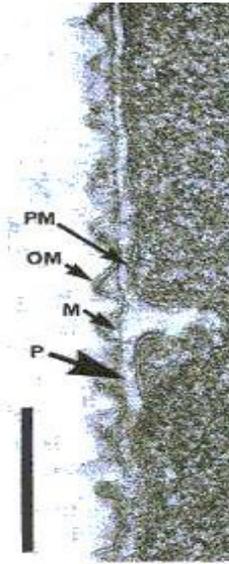
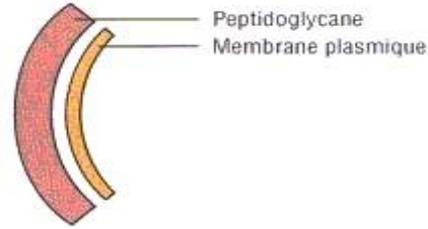
cytoplasme = contenu cellulaire clair au MO; comme il n'y a pas d'organite ici, ce mot peut aussi être employé au MET et désigne alors la totalité du contenu cellulaire, le nucléoïde COMPRIS.

hyaloplasme = contenu cellulaire clair au ME : le contenu dépend du grossissement (eau, sels minéraux, de nombreux systèmes enzymatiques organisés, PAS de cytosquelette, ADN [petites boucles circulaires appelées **plasmides**], ARN...)

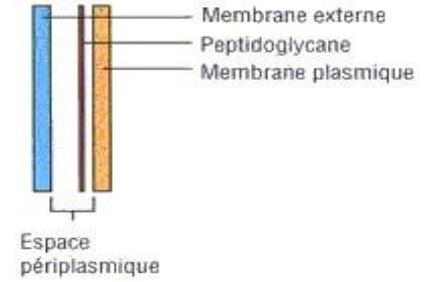




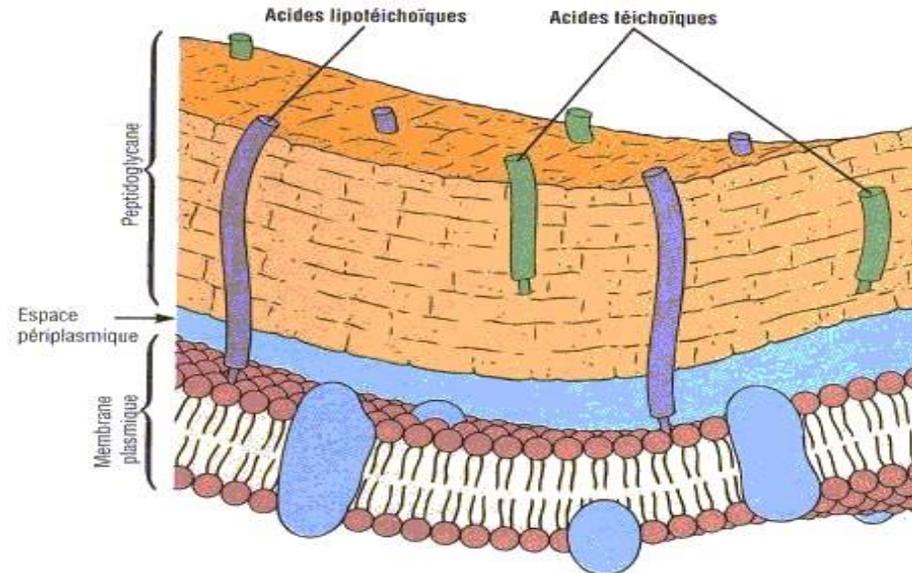
Paroi d'une cellule Gram-positive



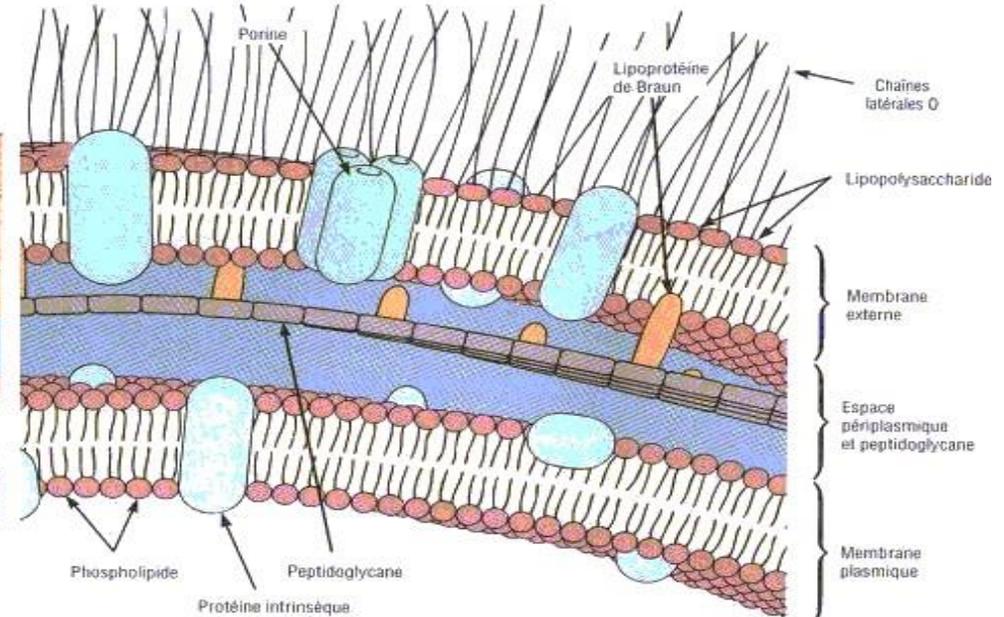
Paroi d'une cellule Gram-négative



La paroi cellulaire des bactéries Gram-positives et Gram-négatives. L'enveloppe d'une bactérie Gram-positive, *Bacillus licheniformis* (à gauche) et d'une bactérie Gram-négative, *Aquaspirillum serpens* (à droite) au microscope électronique. *M*, peptidoglycane ou muréine; *OM*, membrane externe; *PM*, membrane plasmique; *P*, espace périplasmique; *W*, peptidoglycane de la paroi bactérienne Gram-positive. La barre mesure 100 nm.



L'enveloppe des bactéries Gram-positives.



L'enveloppe des bactéries Gram-négatives.

Production d'ATP chez les bactéries

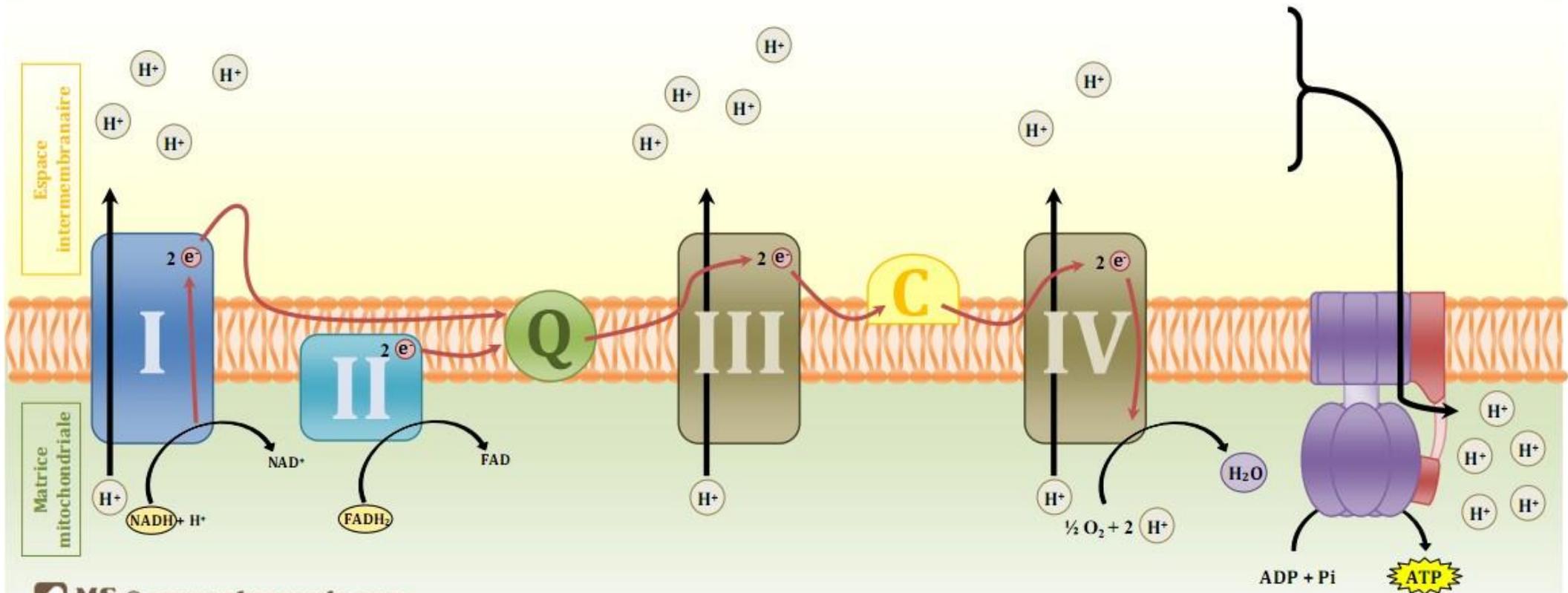


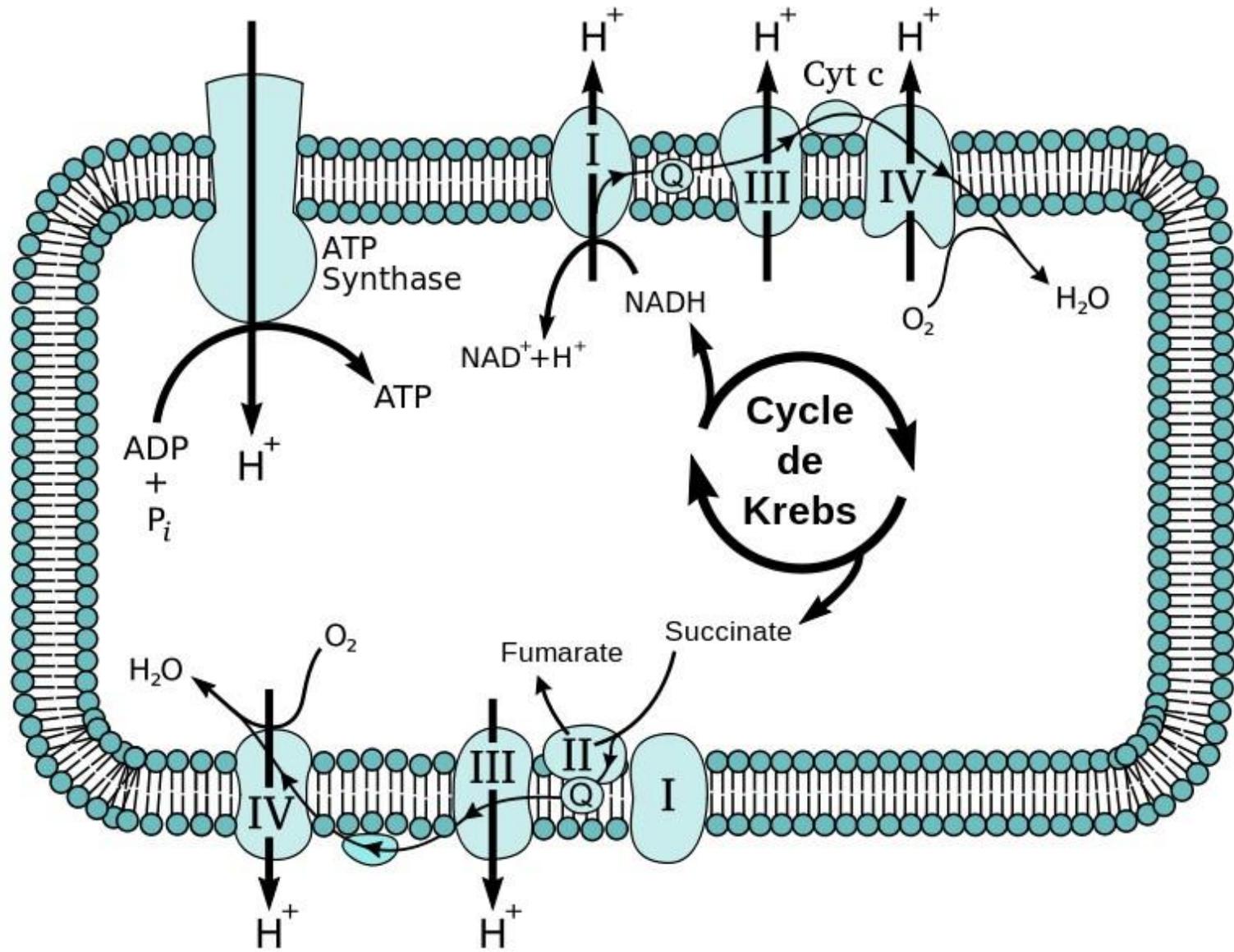
Schéma simplifié représentant les mécanismes de la chaîne respiratoire et de la synthèse d'ATP par phosphorylation oxydative.

La chaîne respiratoire correspond à une chaîne de complexes protéiques présents au sein de la membrane interne de la mitochondrie et responsables de la production d'ATP à partir du NADH et du FADH_2 produits lors des différentes voies cataboliques de l'organisme.

Cette production d'énergie est permise grâce à la formation d'un gradient électrochimique de proton dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie, lui-même formé par l'énergie des électrons provenant du NADH et du FADH_2 . Les électrons riches en énergie récupérés seront transportés successivement via les différents complexes :

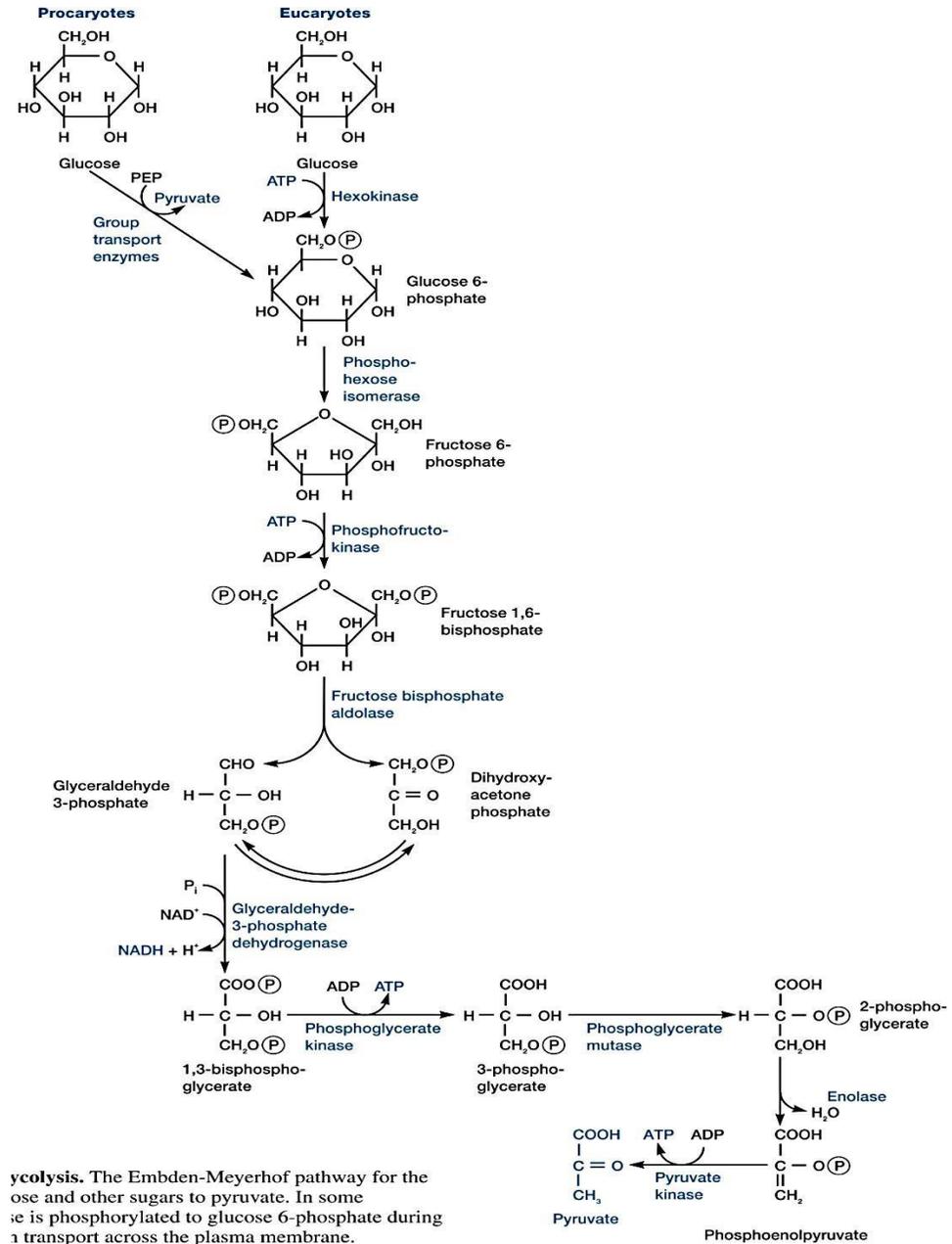
- Le **complexe I** a une action **NADH coenzyme Q réductase**, récupérant les électrons du NADH et permet le transport de 4 protons de la matrice mitochondriale à l'espace inter-membranaire.
- Le **complexe II** a une action **Succinate coenzyme Q réductase**, récupérant les électrons du FADH_2 et permet le transport d'aucun proton.
- Le **complexe III** a une action **Coenzyme Q cytochrome C réductase**, et permet le transport de 4 protons de la matrice mitochondriale à l'espace inter-membranaire.
- Le **complexe IV** a une action **Cytochrome C oxydase**, et permet le transport de 2 protons de la matrice mitochondriale à l'espace inter-membranaire.
- Le **coenzyme Q** (ou **ubiquinone**) permet la transition entre le complexe I ou II et le complexe III.
- Le **cytochrome C** permet la transition entre le complexe III et le complexe IV.

Suite à la chaîne de complexe protéique, le dernier accepteur d'électrons est l'oxygène qui sera ainsi à l'origine de la formation de molécule d'eau. Le NADH permettra donc le transport de **10 protons** de la matrice mitochondriale à l'espace inter-membranaire, tandis que le FADH_2 de seulement **6**. Ceux-ci repasseront vers la matrice mitochondriale via une pompe à proton que l'on appelle également l'**ATP-synthétase**, et qui sera à l'origine de la formation d'ATP.



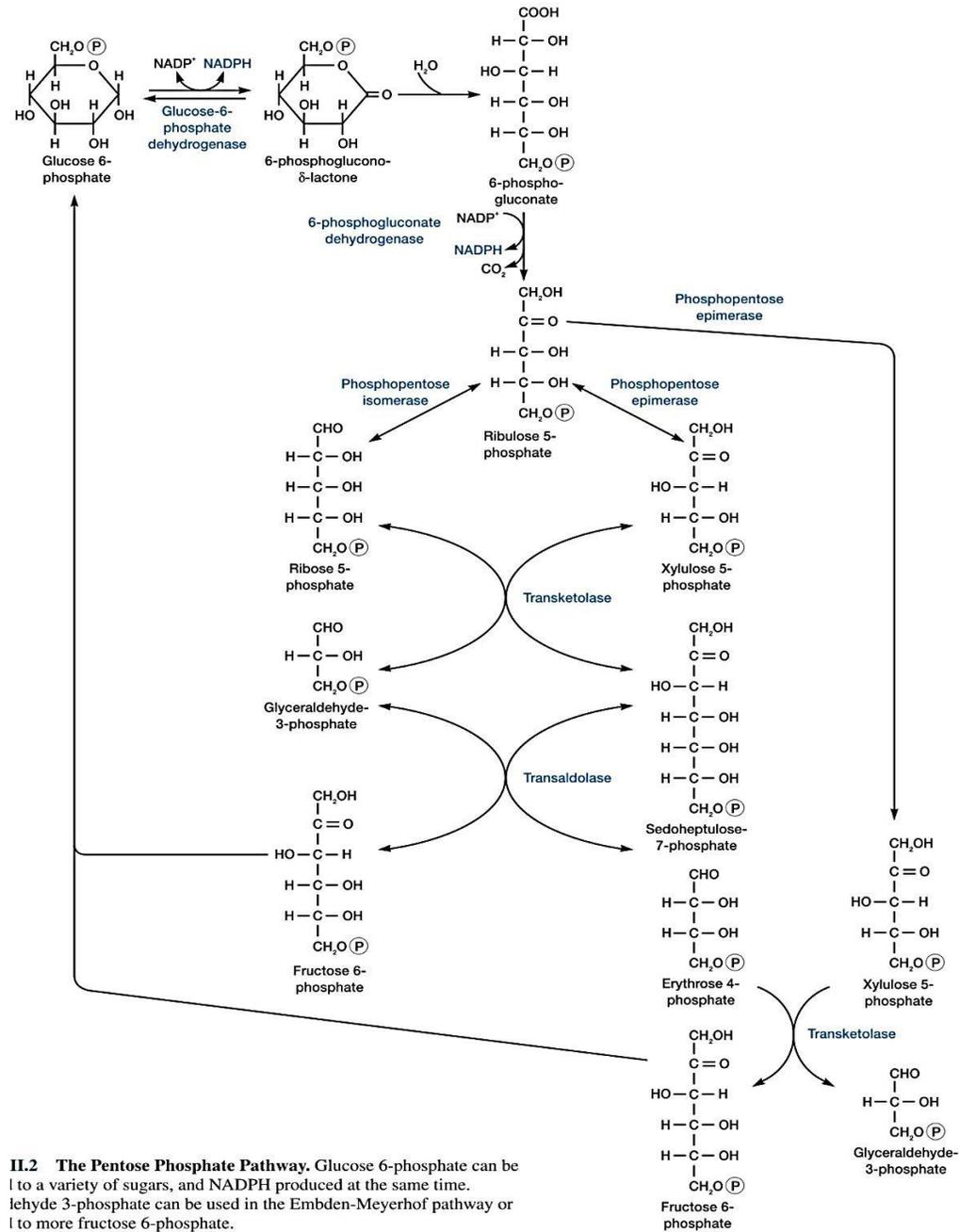
2) Voies Métaboliques

Glycolyse

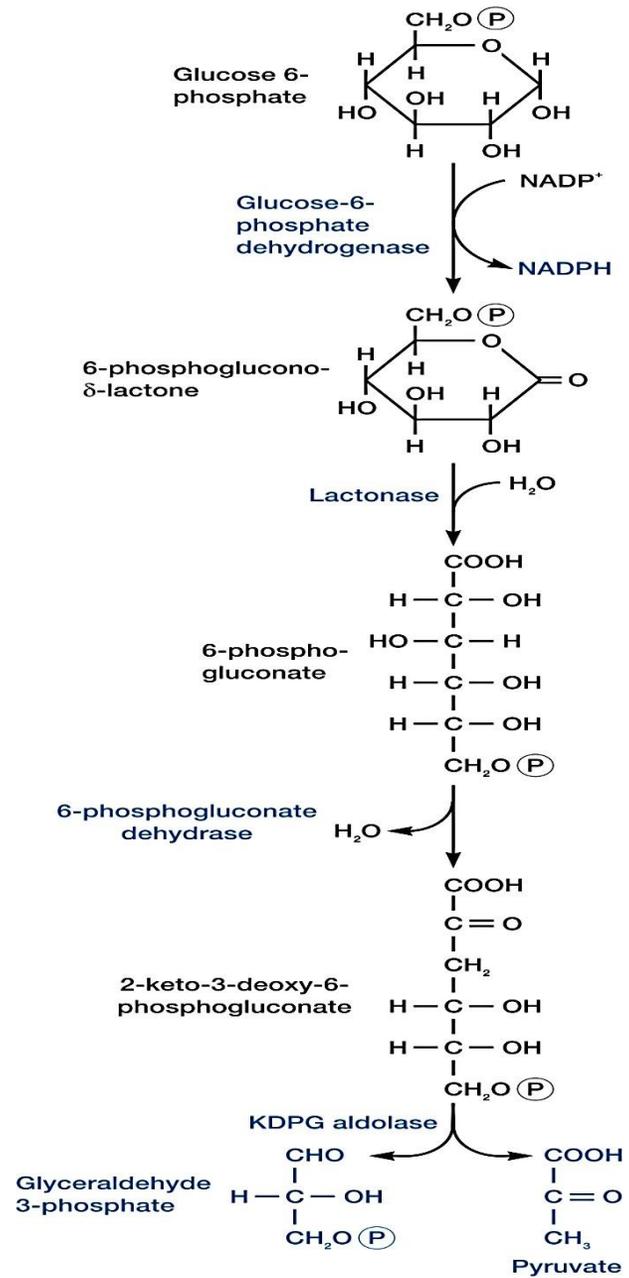


glycolysis. The Embden-Meyerhof pathway for the conversion of glucose and other sugars to pyruvate. In some organisms, glucose is phosphorylated to glucose 6-phosphate during transport across the plasma membrane.

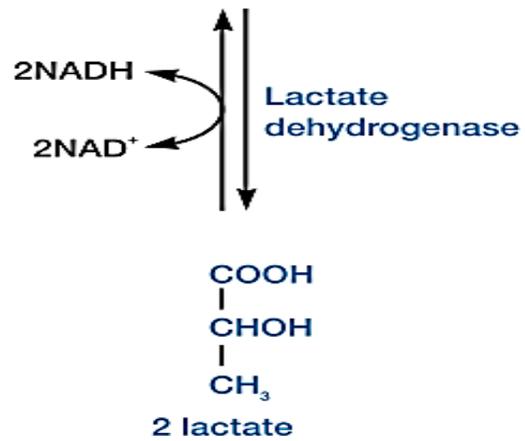
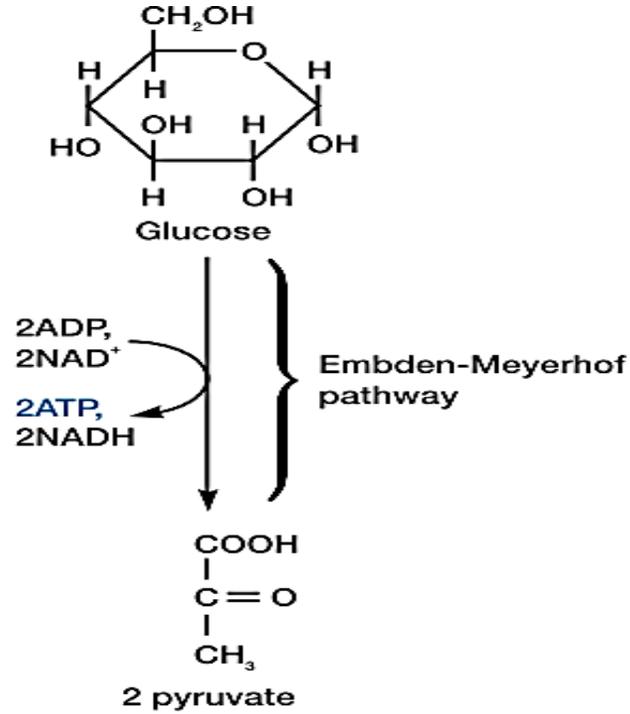
Pentose phosphate



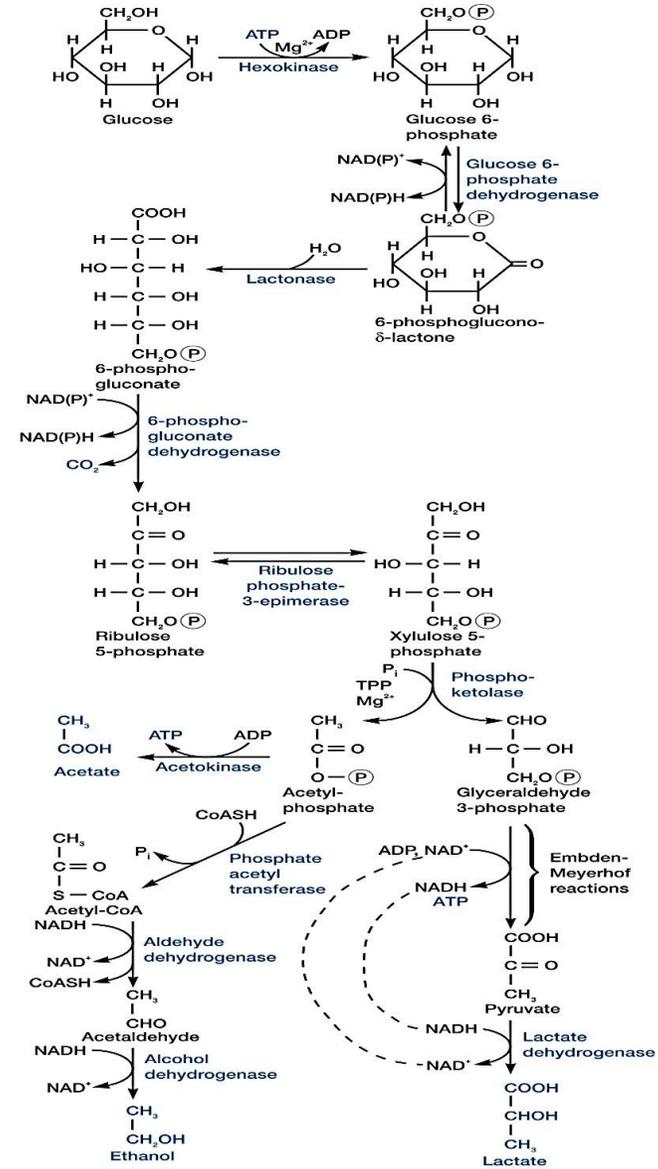
IL.2 The Pentose Phosphate Pathway. Glucose 6-phosphate can be converted to a variety of sugars, and NADPH produced at the same time. Glyceraldehyde 3-phosphate can be used in the Embden-Meyerhof pathway or converted to more fructose 6-phosphate.



Entner-Doudoroff

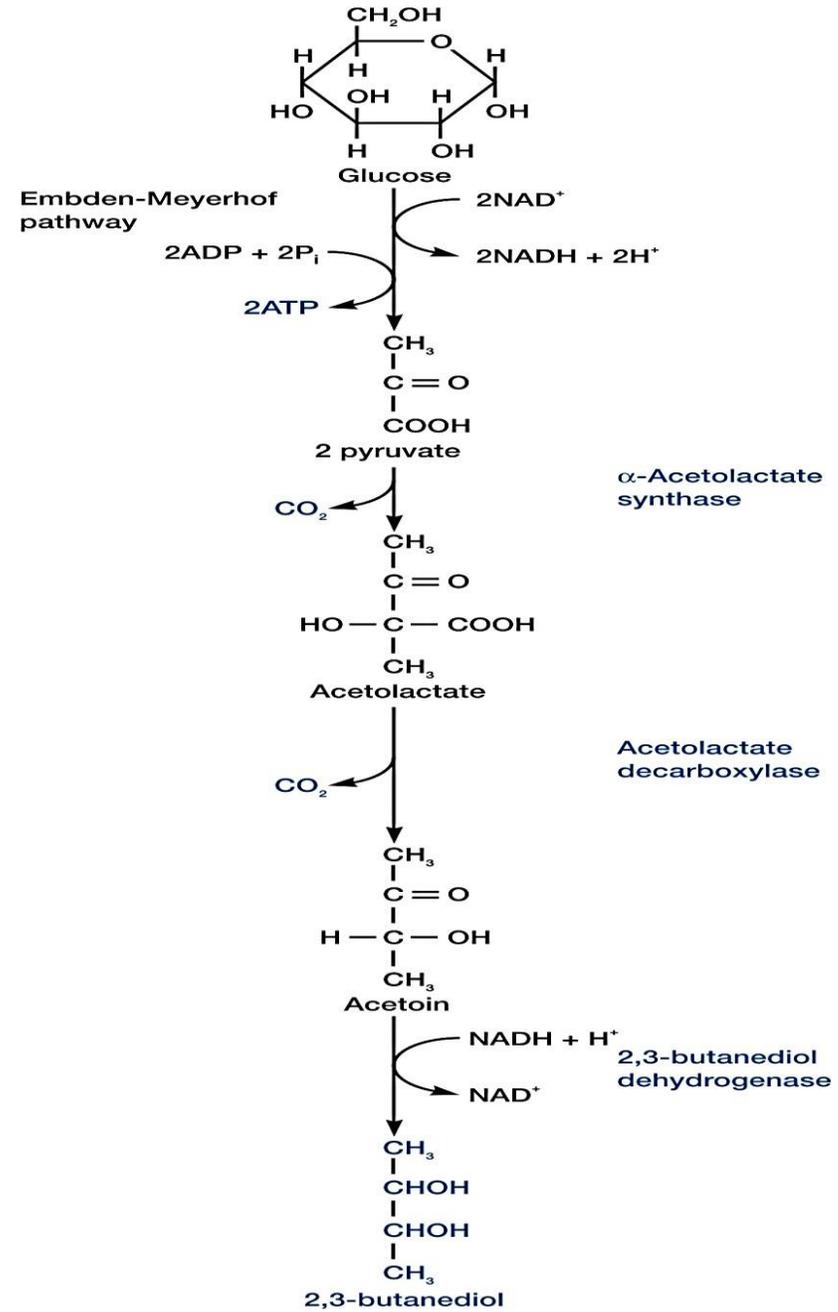


(a)

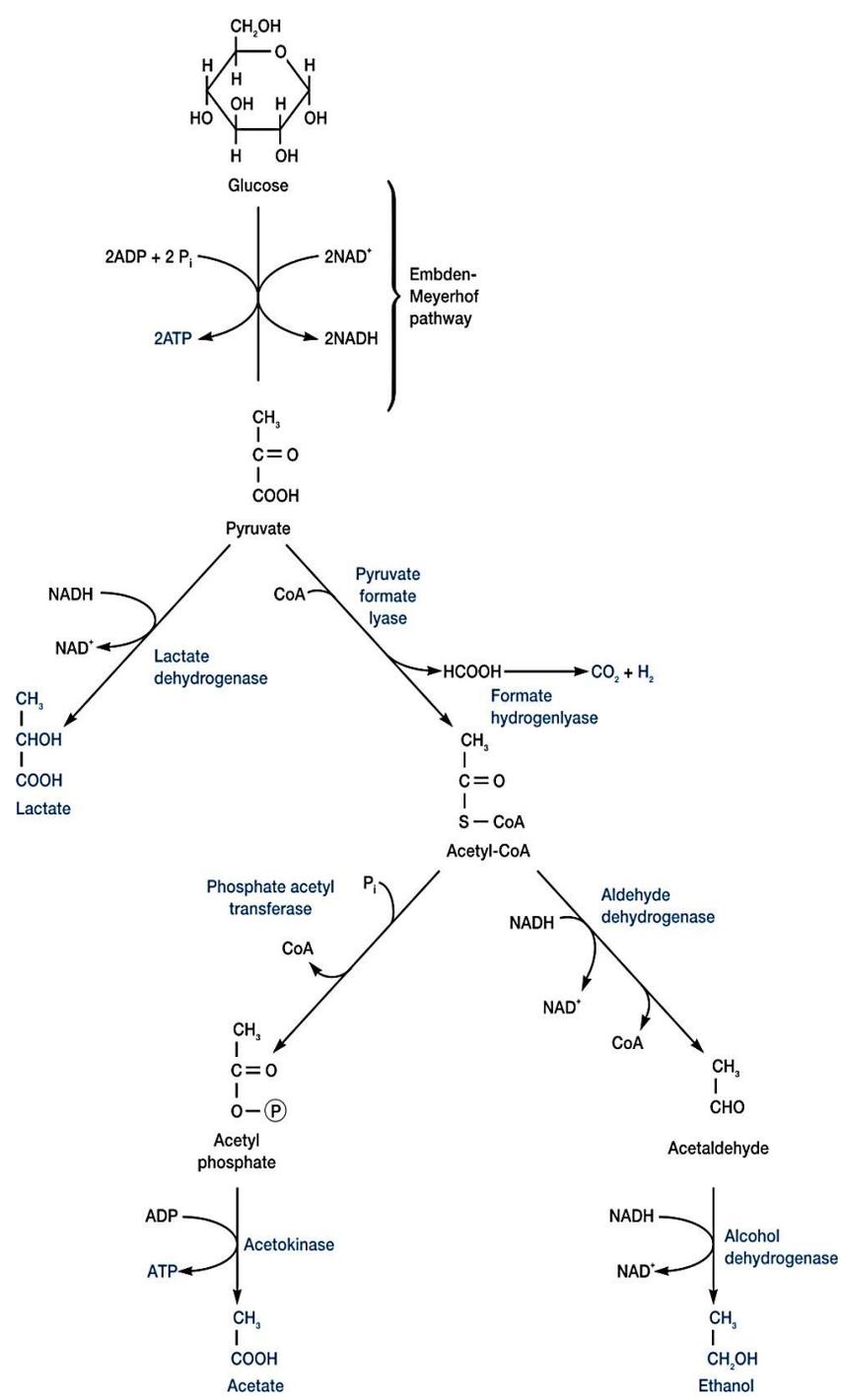


(b)

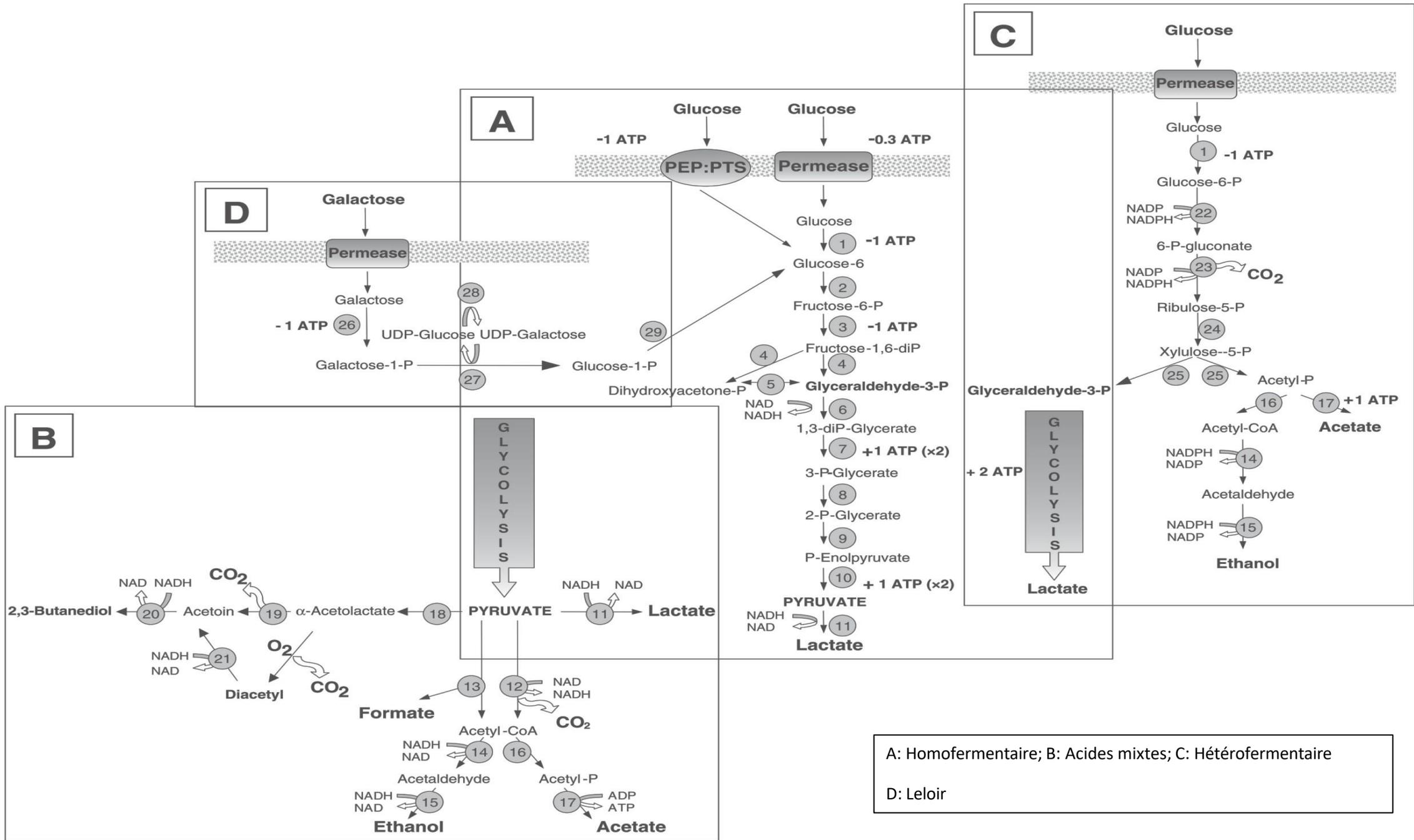
Voie homofermentaire et voie hétérofermentaire



La voie du butandiol



Voie des acides mixtes



Métabolisme des protéines et acides aminés

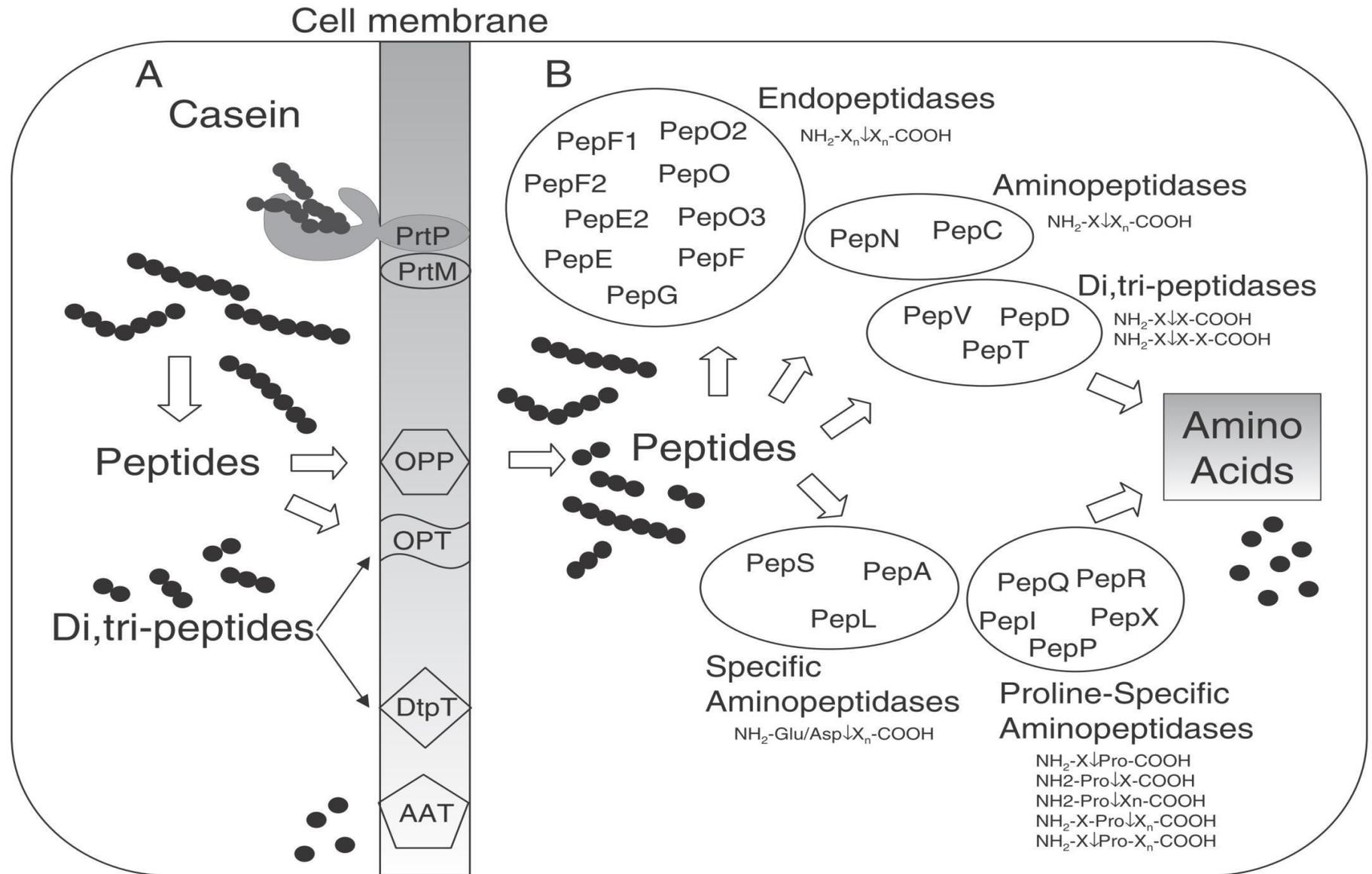


Figure 1.2. Diagram of the proteolytic systems of lactic acid bacteria. Location and targets of the different components are indicated. The pentagon at the bottom of the cell membrane marked as AAT refers to the different types (about 14) of amino acid transporters. Action and specificity of peptidases over a schematic peptide is indicated by arrows.

Catabolisme des principaux acides aminés et production d'arômes

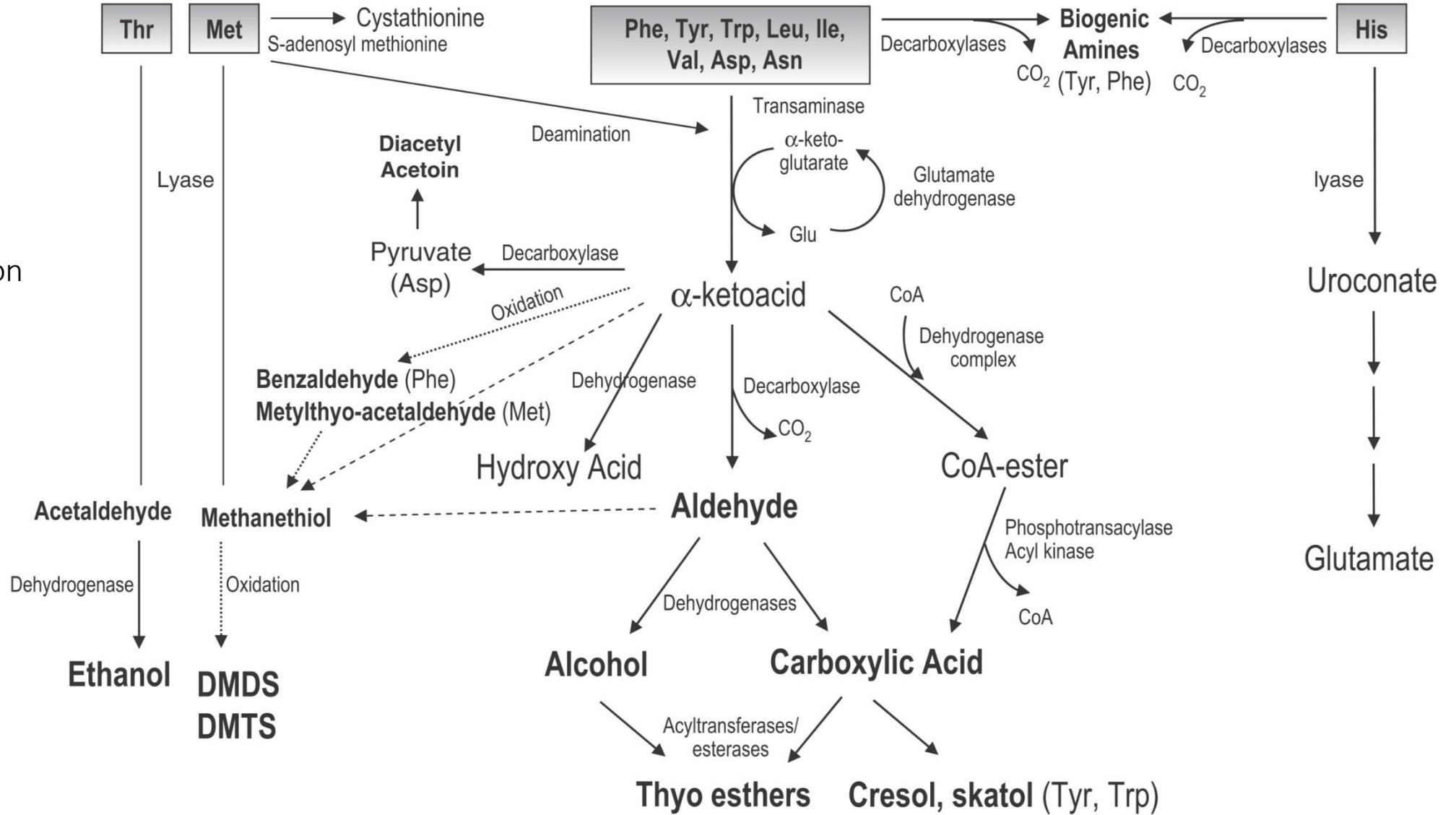


Figure 1.3. Catabolic pathways of the principal amino acids involved in the production of aroma compounds. Continuous lines show enzymatic reactions catalyzed by the enzymes indicated. Dotted and broken lines show spontaneous chemical reactions and poorly defined pathways, respectively. The most important compounds formed are shown in bold.

Métabolisme du citrate et production d'arome

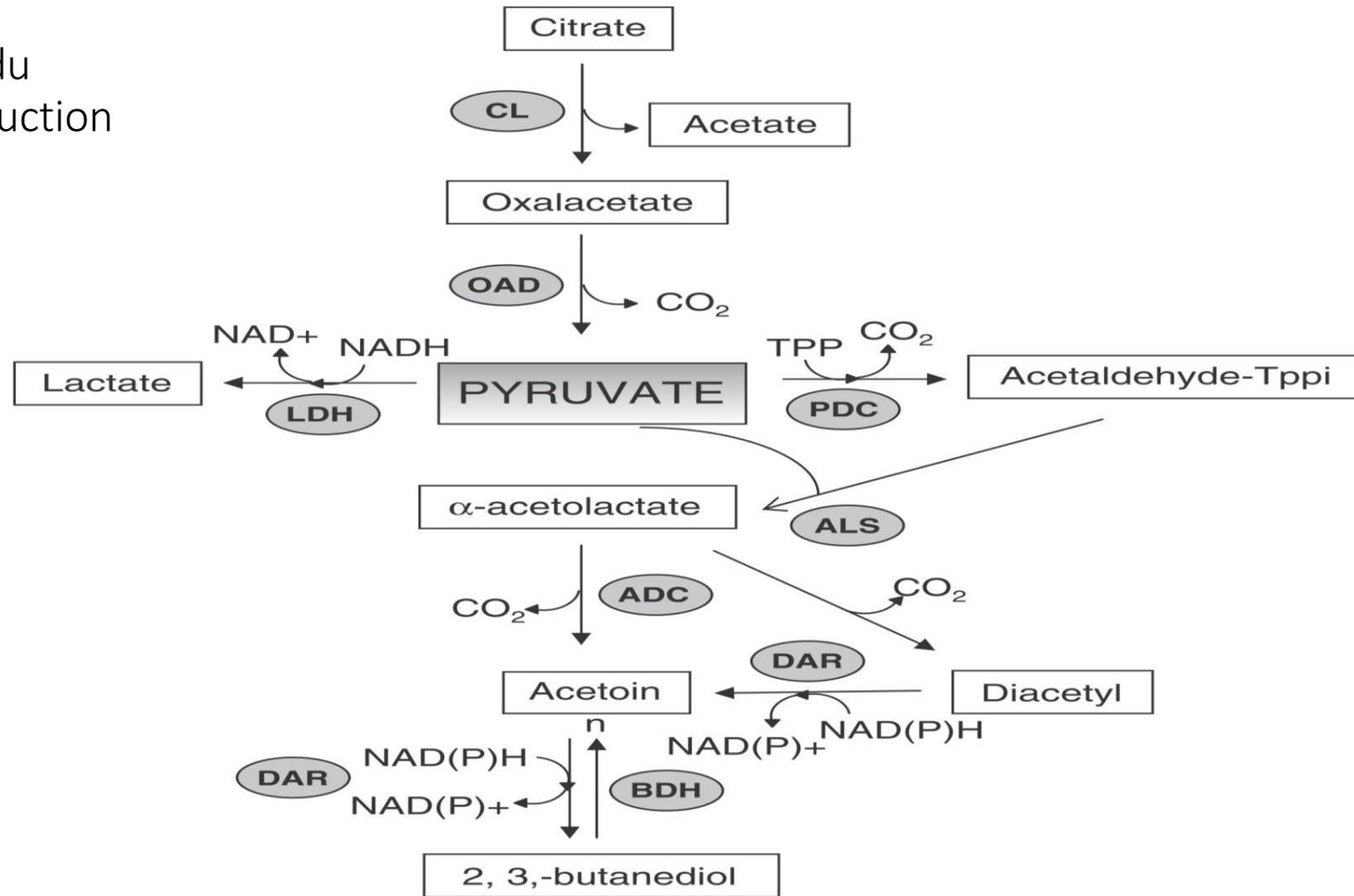
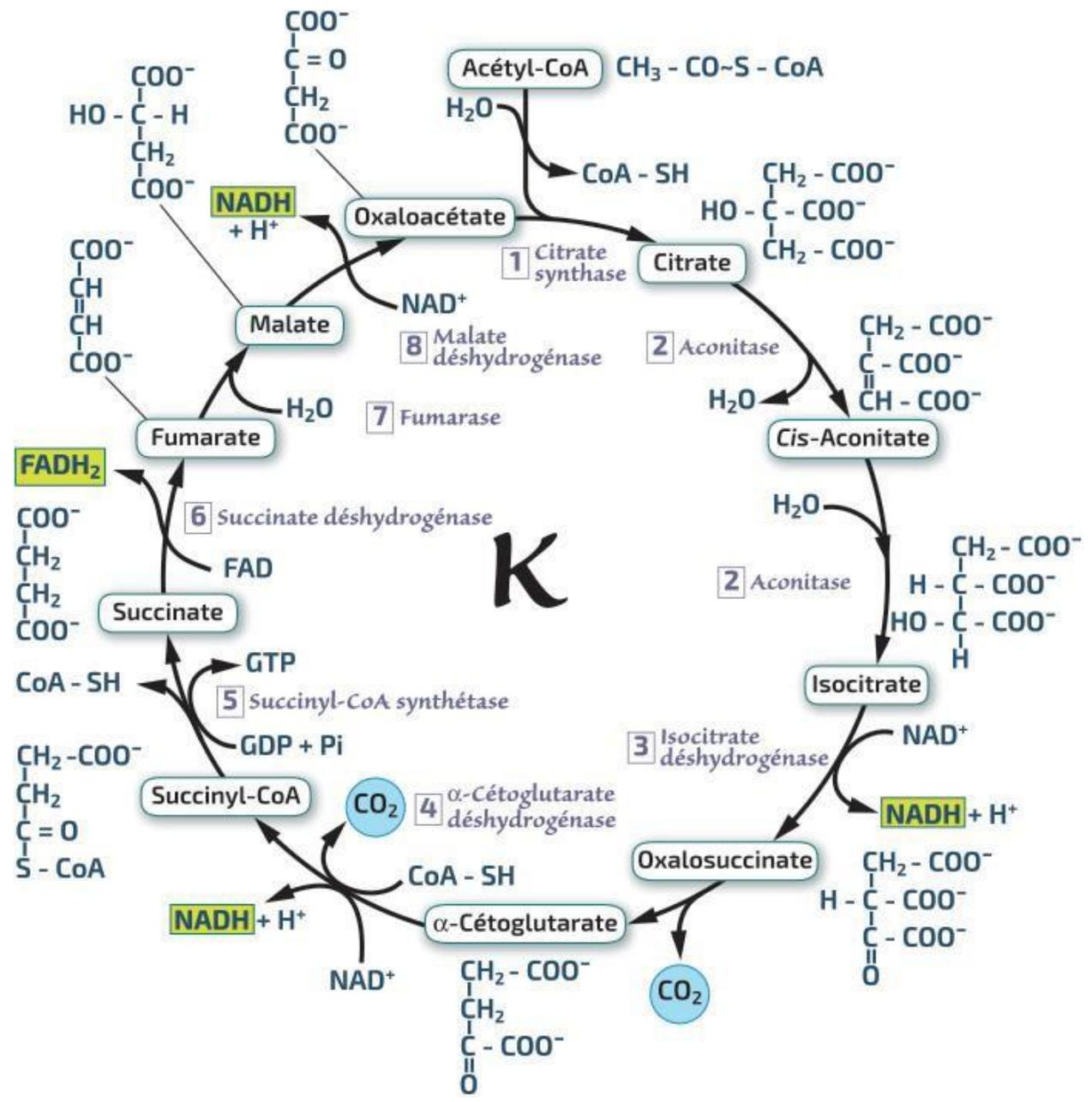
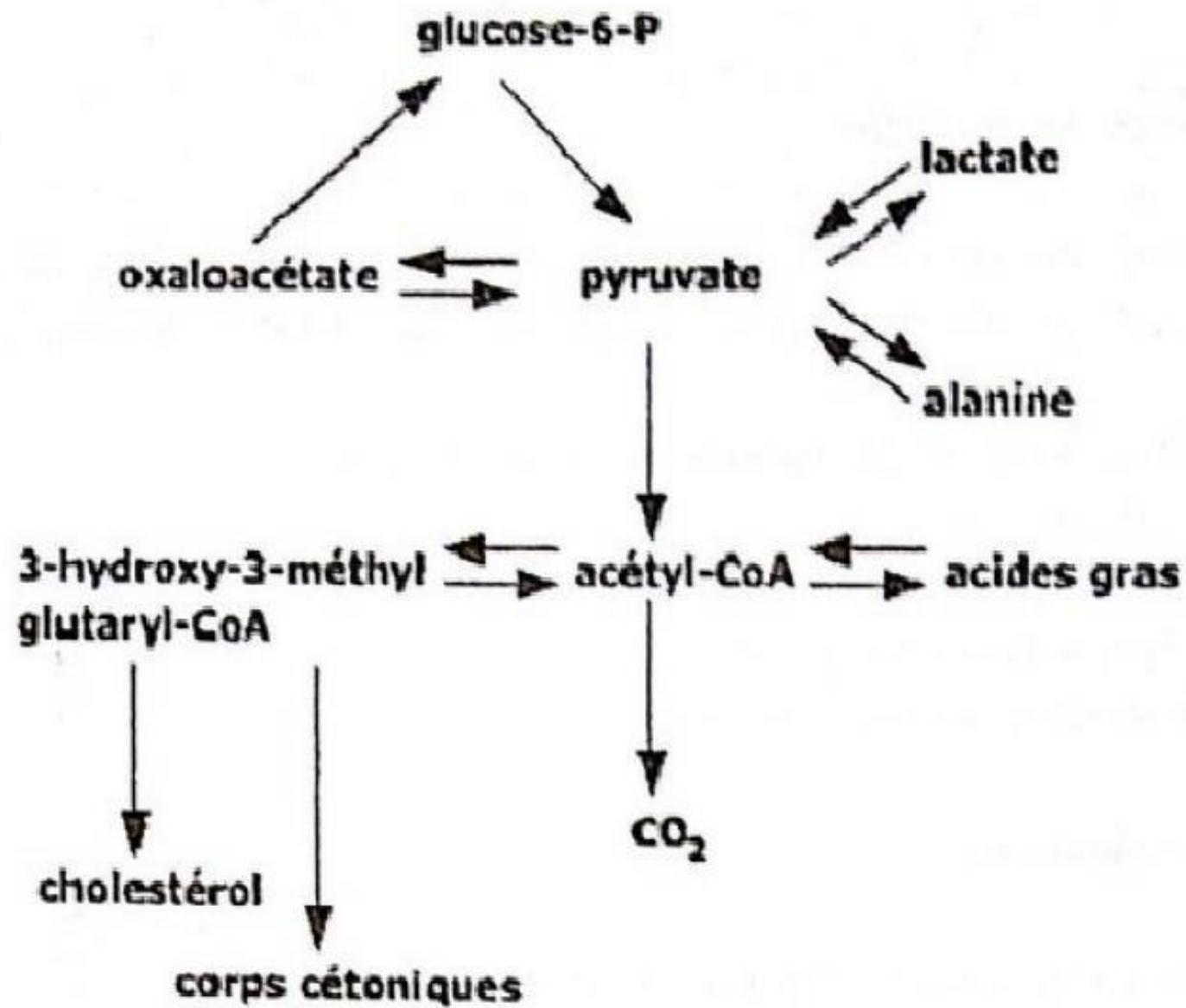
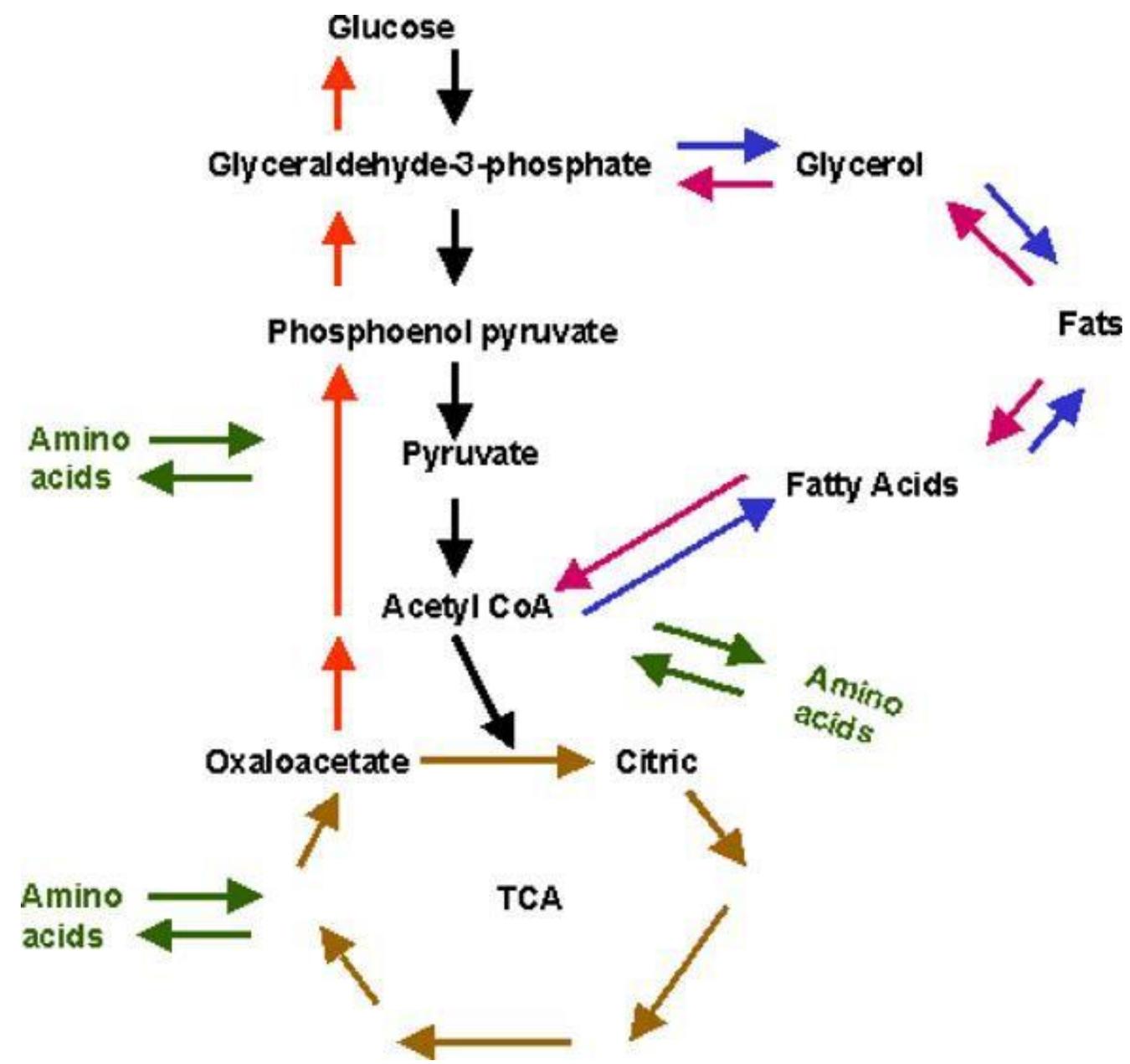


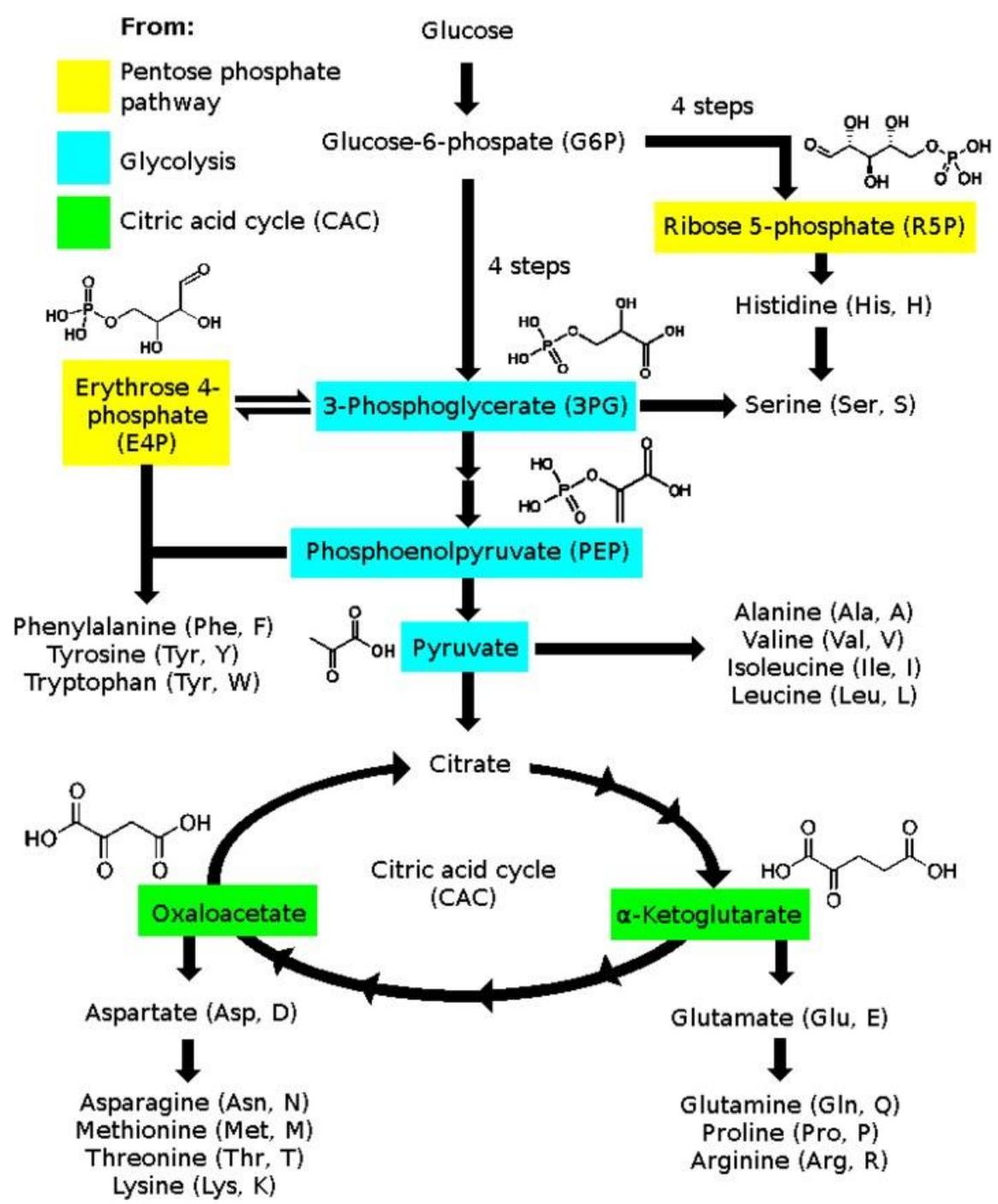
Figure 1.4. Citrate metabolism in *Lactococcus* and *Leuconostoc* species. Key for the enzymes: CL, citrate lyase; OAD, oxaloacetate decarboxylase; LDH, lactate dehydrogenase; PDC, pyruvate decarboxylase; ALS, α -acetolactate synthase; ADC, α -acetolactate decarboxylase; DAR, diacetyl acetoin reductase; BDH, 2,3-butanediol dehydrogenase; Tppi, thiamine pyrophosphate.

3) Voies carrefours du métabolisme central et secondaire

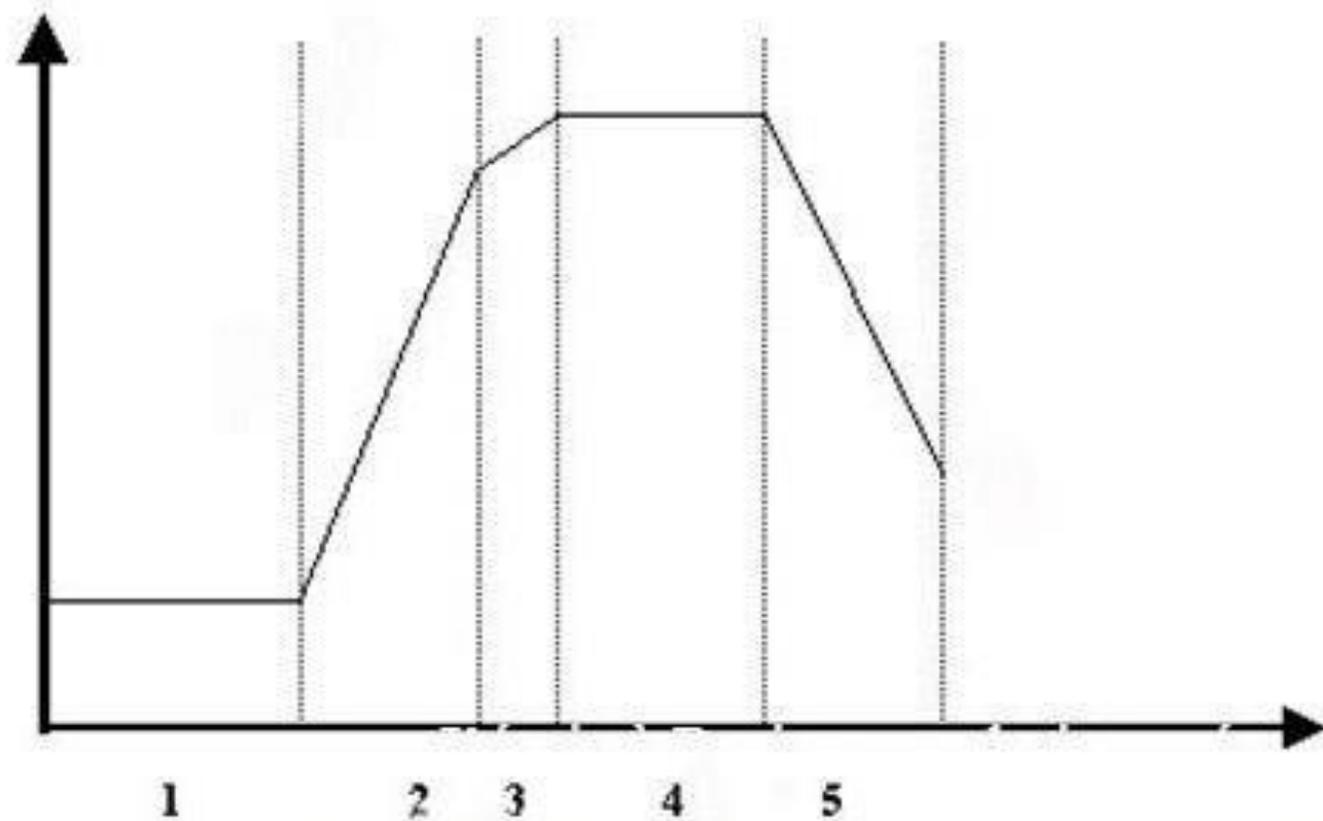








**4) Phase de production des métabolites
secondaires**



- 1 : phase de latence,
2 : phase de croissance exponentielle,
3 : phase de ralentissement,
4 : phase stationnaire,
5 : phase de déclin.

Chapitre 2

Les enzymes: molécules bioactives

INTRODUCTION

Contexte historique

- 1750-1760, Réaumur et Spallanzani

⇒ **activité enzymatique**

expérience sur suc gastrique du gésier d'oiseaux

(digestion in-vitro de viande ou grains pré-broyés)

- 1833-1870 : Payen et Persoz sur extraits d'orge en germination ⇒ peuvent transformer l'amidon (principe actif 1000 fois supérieures à sa masse)

- 1878 : Von Kühne sur levures = substance responsable de fermentations

⇒ l'appelle **enzyme** (du grec "en" = **dans** et zûmé" = **le jus**)

- 1890 : Fisher **défini** propriétés principales des enzymes = **protéines** jouant rôle de **catalyseurs** biologiques à très forte efficacité
- 1910 : V. Henri et Michaëlis = définition des **paramètres cinétiques**

- 1950 : Purification, identification et caractérisation de l'**uréase** par Summer
- 1960 : Sanger (deux fois Nobel) **synthèse chimique RNase** (la plus petite enzyme : 13 700 Da)
- 1960 : J. Monod et Koshland étudient l'**allostérie** et la cinétique catalytique \Rightarrow notion de régulation

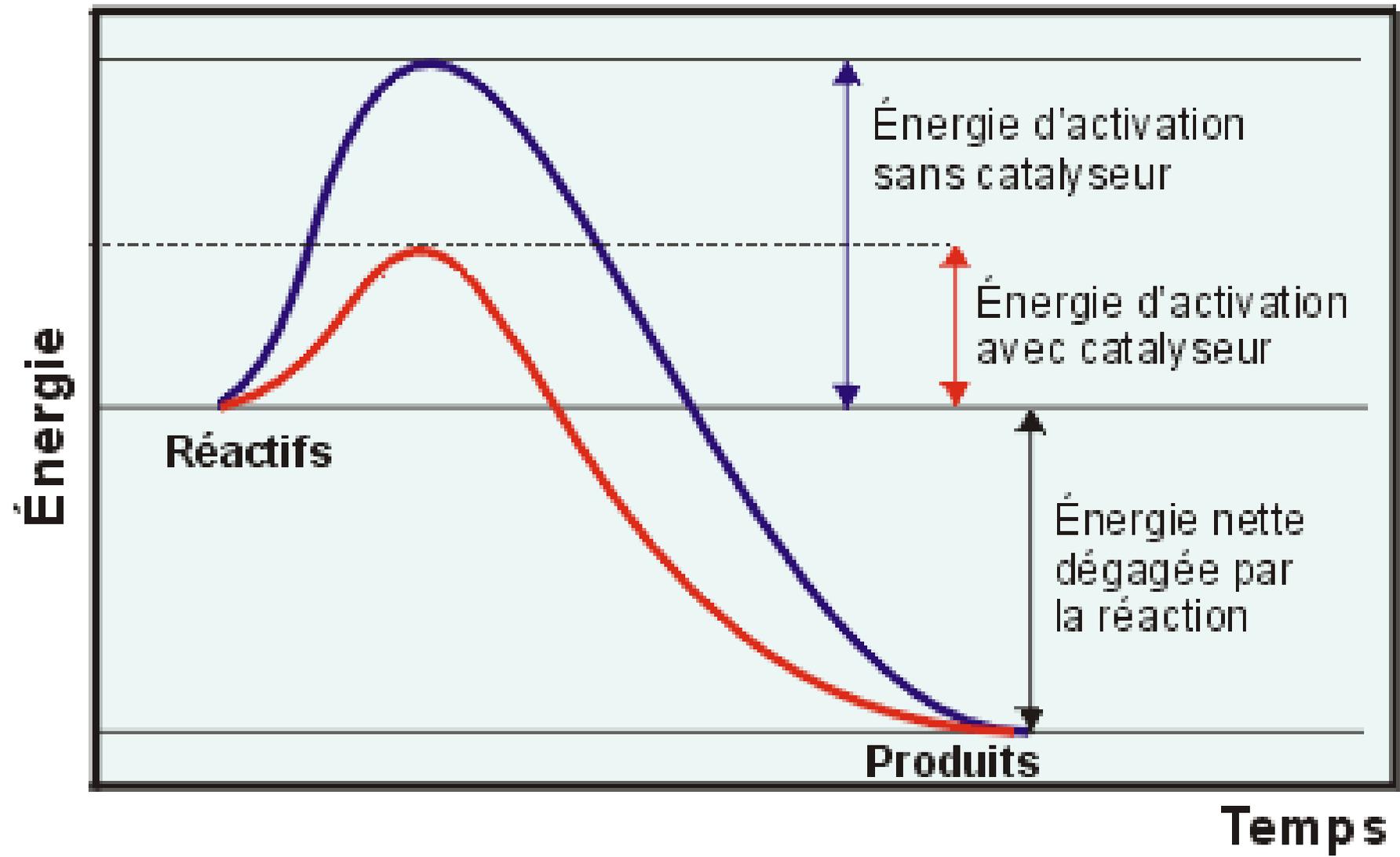
I. Les enzymes catalysent des réactions spécifiques

A. Les enzymes = des biocatalyseurs

Définition d'un biocatalyseur :

facilite les réactions du catabolisme et de l'anabolisme avec des vitesses compatibles avec la vie

($\cong 37^{\circ}\text{C}$ chez les homéothermes)



A. Les enzymes = des biocatalyseurs

B. Les enzymes = 3 types de spécificités

**1. Spécificité de substrat et
notion de site actif**

Le **site actif** d'une enzyme est la région tridimensionnelle qui se lie au substrat. Il assure deux fonctions :

-fixation du substrat (site de fixation , de reconnaissance)

-transformation du substrat (site catalytique)

-Les autres AA sont qualifiés d'auxiliaires, de collaborateurs ou de non collaborateurs selon leur degrés d'intervention dans l'acte catalytique



b) TRES PETITES TAILLE du site catalytique

- Taille d'un site catalytique < **10** acides aminés
- Modification (génie génétique) d'un seul acides aminés (déplace < 1 Å modifie l'activité de l'enzyme en moyenne par 1000)

c) 2 types de mécanismes d'action catalytique

La catalyse acide-base : le plus courant

- Accélération de la réaction par transfert d'un proton
Ex. de la chaîne latérale de l'histidine dont $6 < pK_a < 7$;
à pH physiologique = groupe donneur / accepteur de proton
- Accélèrent X 10 à 100 fois en général.

Accélérations couramment observés = 10^7 à 10^{17}

⇒ l'effet de voisinage (fixation de S au site actif augmente la concentration effective du substrat par rapport à sa concentration à l'état libre en solution) ⇒ augmente la fréquence de formation de l'état de transition.

a) Effet du pH sur les réactions enzymatiques

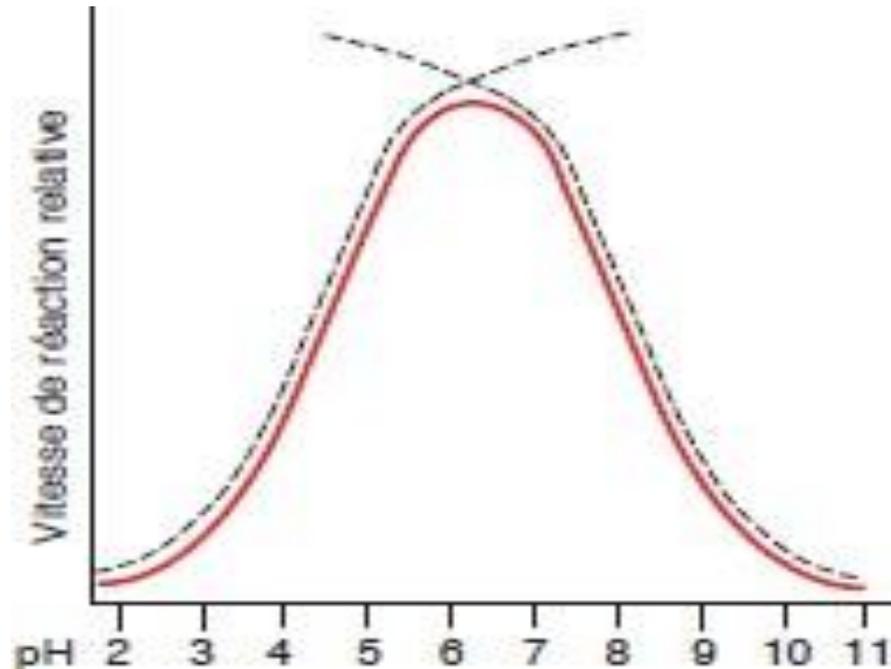
- ∃ **étroite zone de pH optimum**

- Renseigne sur nature des a. a. qui participent aux différentes étapes du processus catalytique

- **L'ionisation du substrat** peut exercer un effet sur la fixation de l'enzyme

Effet du pH

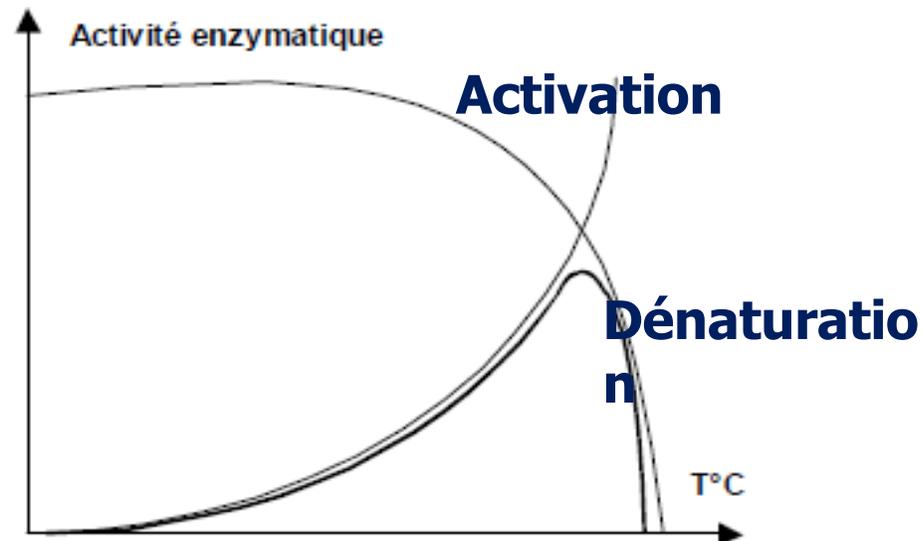
Les enzymes sont des protéines constituées d'acides aminés pouvant porter des fonctions chimiques sensibles aux variations de pH. Ces fonctions chimiques peuvent se protonner ou se déprotonner selon le pH du milieu dans lequel se trouve l'enzyme. Les enzymes auront par conséquent des pH optimaux différents, selon leur structure et la nature de leur site actif. La pepsine a un pH optimal de 1,5, appropriée pour un enzyme gastrique; la trypsine intestinale a plutôt un pH optimal de 7,7.



Effet de la température

- Une augmentation de la température:
- augmente la vitesse de la réaction chimique
- augmente la vitesse de dénaturation de l'enzyme (une protéine), diminuant ainsi son activité catalytique
- A températures élevées, fluctuations importantes de la structure 3D de la protéine avec perte de structure tertiaire : dénaturation thermique, souvent irréversible.

La somme de ces deux effets donne une courbe caractéristique de l'activité enzymatique température qui passe par un maximum, montrant ainsi l'existence d'une température optimale.



b) Effet de la température - protection partielle par le substrat contre la dénaturation de l'enzyme

Ex. de la Trypsine :. La température de dénaturation est supérieure lorsque l'enzyme est associée au substrat par rapport à l'enzyme seule. Conclusion : **le substrat protège l'enzyme**

c) Cofacteurs / coenzymes parfois indispensables

c1- Type d'enzyme à cofacteur

- Notion de cofacteurs : "dents chimiques" des enzymes
- Réalisent surtout des réactions acido-basiques, établissement de liaisons covalentes et transfert de groupe, interactions entre charges

c2- Cofacteur métallique ou coenzyme (organique)

- Ion métallique : ex : Zn^{2+} de la carboxypeptidase A
 - Coenzyme = cofacteur organique
- ex.1: NAD⁺ (Nicotine amine Adénosine dinucléotide) des déshydrogénases de la YADH (Yeast Alcohol Deshydrogenase) qui fait interconversion éthanol/acétaldéhyde (stéréospécifique cf. Voet p. 318)

Cofacteurs:

<i>Enzyme</i>	<i>Type</i>	<i>Cofacteurs</i>	<i>Nom</i>
Subtilisine (protéase)	Hydrolase	aucun	
Glucose isomérase	Isomérase	Co²⁺, Mg²⁺	ion
β-galactosidase	Hydrolase	Na⁺, K⁺	ion
Acide lactique déshydrogénase	Oxydoréductase	NAD⁺	coenzyme « libre »
Glucose oxydase	Oxydoréductase	FAD	coenzyme : « groupement prosthétique »
		Fe	ion
Peroxydase	Oxydoréductase	Hème (Fe²⁺)	groupement prosthétique

c4- Régénération nécessaire des coenzymes

- Leur retour à leur forme initiale peut se faire par une autre enzyme, même dans un autre compartiment (cytosol et stroma mitochondrial pour le NAD⁺/NADH de la glycolyse).
- Sinon, bloque la réaction (par manque de cofacteur).

Applications des enzymes

Sector	Enzymes	Applications	References
Pharmaceuticals	Nitrile hydratase, transaminase, monoamine oxidase, lipase, penicillin acylase	Synthesis of intermediates for production of active pharmaceutical ingredients	[2,4,30–38]
Food Processing	Trypsin, amylase, glucose isomerase, papain, pectinase	Conversion of starch to glucose, production of high fructose corn syrup, production of prebiotics, debittering of fruit juice	[2,5,9–12,39–43]
Detergent	Protease, lipase, amylase, cellulase	Stain removal, removal of fats and oils, color retention,	[44–48]
Biofuels	Lipase, cellulase, xylanase	Production of fatty acid methyl esters, decomposition of lignocellulotic material for bioethanol production	[18,19,44,49–57]
Paper and Pulp	Lipase, cellulase, xylanase	Removal of lignin for improved bleaching, improvement in fiber properties	[2,4,44,58–61]

Chapitre 3

Les antimicrobiens : caractéristiques
et intérêts biotechnologiques

1) Historique et définition des bactériocines

➤ **Les polypeptides antimicrobiens** : Tous les organismes vivants (eucaryotes ou procaryotes)

en produisent

- Chez les bactéries, ces polypeptides sont connus sous le nom de « bactériocines ».

➤ La première bactériocine (colicine) fut découverte **par Gratia en 1925** (*E. coli* V contre *E. coli* φ)

« principe V »

- Gratia et Fredericq 1946 nommèrent cette substance « colicine» (une protéine ayant un spectre d'activité très restreint)

Chez les **bactéries lactiques**, la première bactériocine découverte est la « Nisine»
(*Lactococcus lactis*) **Rogers et Whittier en 1928**)

- Le terme de « bactériocine » (Jacob *et al.* 1953):
 - une activité bactéricide intra-espèce par fixation sur des récepteurs spécifiques sur la surface des cellules cibles (définition typique à la colicine).

- Nouvelles bactériocines atypiques (produites par les bactéries Gram positif) à cette définition (large spectre d'activité)

➤ **Définition de bactériocines (Tagg *et al.* 1976)** (la plus largement acceptée jusqu'à nos jours):

- Protéines, ou complexes protéiques

- Activité bactéricide ou bactériostatique contre des espèces proches de l'espèce productrice.

- **Définition (Cotter *et al.* 2006)** (plus adaptée à toutes les bactériocines connues)
- des substances d'origine bactérienne,
 - de nature protéique,
 - synthétisées par des ribosomes
 - inhibent la croissance de bactéries typiquement proches de la bactérie productrice
 - la bactérie productrice exprime, quant à elle, une immunité spécifique contre sa propre bactériocine

NB: les bactériocines sont différentes des antibiotiques polypeptidiques

3) Structure et classification des bactériocines

- **Classification:** Taille, structure, mode d'action et le Gram de leur bactérie productrice

3.1. Les bactériocines des bactéries Gram négatif

- Deux familles principales:
 - des protéines à haut poids moléculaires (30-80 kDa) « Colicines »
 - des peptides à faible poids moléculaires (entre 1 et 10 kDa) « Microcines ».

Produites principalement par (*E. coli*)

- Les colicines: induction SOS, qui joue un rôle dans la réponse de beaucoup de bactéries en cas d'endommagements de leurs ADN.
- Les microcines sont produits dans des conditions de stress, particulièrement en cas d'épuisement du milieu de culture.

➤ **Caractéristiques des bactériocines des bactéries Gram négatif:**

- Spectre d'activité étroit
- Chacune a un mécanisme d'action spécifique (activité sur l'ADN ou l'ARN, inhibition de la biosynthèse de la paroi ou la formation de pores dans la membrane cytoplasmique de la souche cible)

3.2. Les bactériocines des bactéries Gram positif

- Plus nombreuses
des peptides ou protéines, généralement, bactéricides, cationiques, et agissent en perméabilisant la membrane des cellules cibles (**Nes *et al.*, 1996**).
- Ces bactériocines ont un spectre d'activité plus large Leur activité peut s'étendre même à des bactéries Gram négatif (**Rea *et al.*, 2011**).
- potentiel d'applications dans les domaines agroalimentaire et vétérinaire (**Heng *et al.*, 2007**).
- Les bactériocines des bactéries Gram positif les plus étudiées sont celles produites par des bactéries lactiques : *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium* et quelques espèces du genre *Streptococcus*.

- La classification des bactéries à Gram positif est difficile vu leur hétérogénéité
- Plusieurs classifications ont été proposées mais la plus connue et la plus communément admise est celle établie par **Klaenhammer (1993)**.

Classification de Klaenhammer (1993):

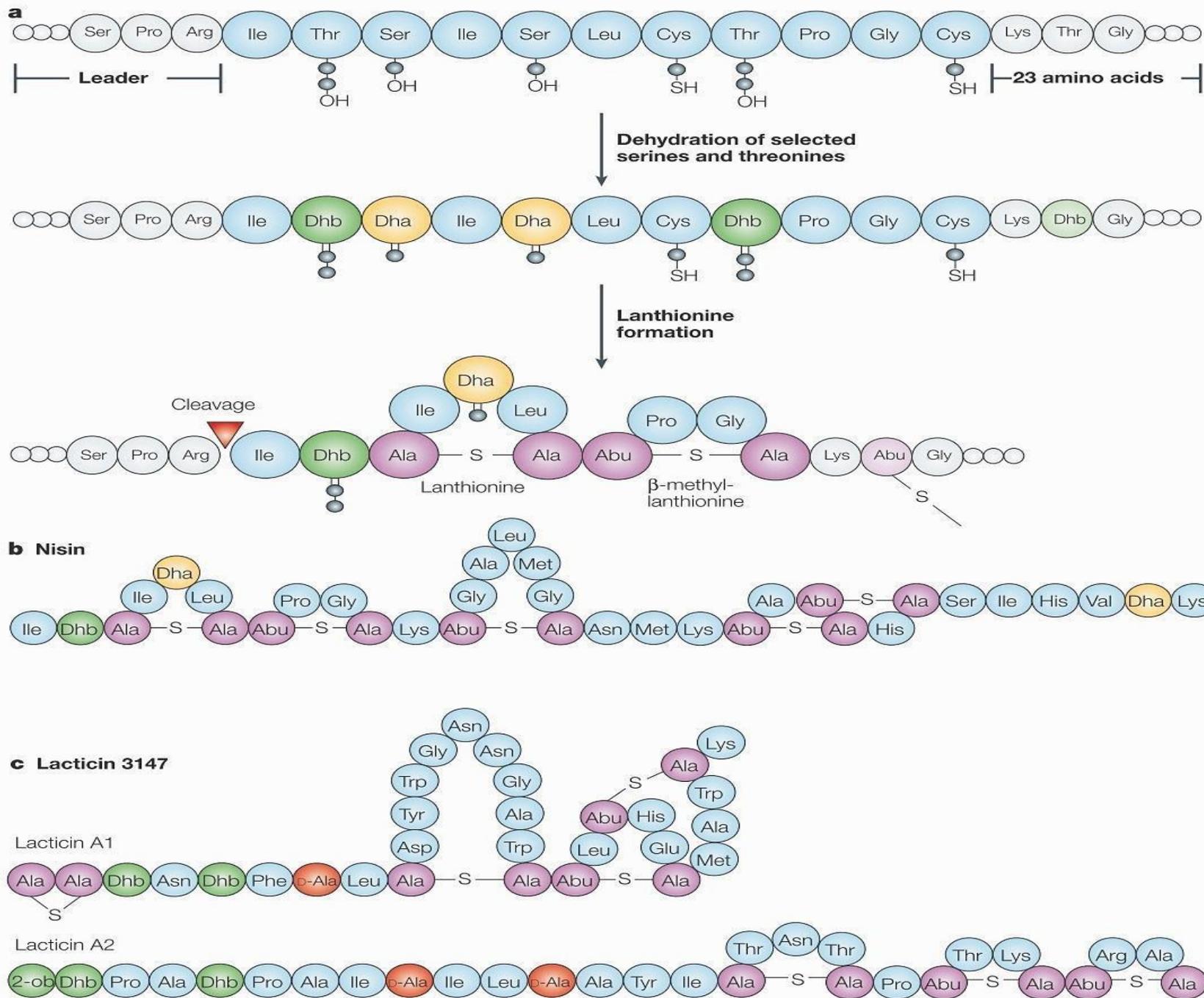
- Bactériocines des bactéries lactiques sont classées en 4 classes sur la base de leur:
 - ✓ la présence ou non de modifications post-traductionnelles.
 - ✓ masse moléculaire,
 - ✓ leur thermostabilité,
 - ✓ leur sensibilité aux enzymes protéolytiques,
 - ✓ leur mode d'action

- **Classe I:** regroupe les bactériocines modifiées ou lantibiotiques
- **Classe II :** inclut les bactériocines non modifiées
- **Classe III:** rassemble les bactériocines thermolabiles à haut poids moléculaire
- **Classe IV:** contient les bactériocines ayant une partie autre que protéique (glucidiques ou lipidique) nécessaire à leur activité biologique.

a) Classe I : Les peptides posttraductionnellement modifiés ou Lantibioltiques.

- peptides de faible poids moléculaires (< 5 kDa et contenant de 19 à 34 acides aminés)
- contenant des acides aminés inhabituels obtenus par modifications post-traductionnelles comme la lanthionine, la β -méthyllanthionine et des acides aminés déshydratés comme la déshydrobutyrine et la déshydroalanine.
- Un de ces acides aminés caractéristiques, la lanthionine, est à l'origine du nom "lantibiotique" « lanthionine-containing antibiotics » (**Willey et van der Donk, 2007**).

La Nisine est la bactériocine de la classe I la plus étudiée.



➤ Certains résidus sérine et thréonine sont déshydratés pour former les résidus didéshydroalanine (Dha) et didéshydrobutyrine (Dhb) respectivement.

➤ Ces acides aminés modifiés réagissent avec le groupement thiol des résidus cystéine formant la lanthionine (Dha-Cys) et la méthyllanthionine (Dhb-Cys)

(Cotter *et al.*, 2005b)

a) Classe II : Les peptides non modifiés (non lantibiotiques) :

- Elle regroupe des peptides hétérogènes de petite taille moyenne en 5 et 10 kDa et qui ne contiennent pas d'acides aminés modifiés (l'unique modification post-traductionnelle possible qu'elles subissent est une formation de ponts disulfures ou une cyclisation N-terminal et C-terminal).
- Elles sont thermostables, cationiques et hydrophobes.
- Dans les solutions aqueuses, ces bactériocines existent dans des conformations non structurées
- Dans des solutions apolaires, elles adoptent une structure secondaire en hélice α .
- Le site de clivage du peptide leader de la pré-bactériocine s'effectue généralement au niveau d'une double glycine (Eijsink *et al.*, 2002 ; Sprules *et al.*, 2004).

Cette classe contient plus de 50 bactériocines, elle est divisée en trois sous-classes :

➤ **Sous-classe IIa :**

- ❖ Ces bactériocines ont une séquence N-terminale conservée **Y-G-N-G-V-X₁-C-X₂-K/N-X₃-X₄-C** (X est un acide aminé quelconque) appelée "Pediocin-box" (pouvant être impliquée dans la reconnaissance d'un récepteur).
- ❖ Elles ont une activité anti-*Listeria monocytogenes* : Carnobactériocines BM1 et B2
- ❖ Elles sont semblables à la pédiocine (première bactériocine de ce groupe à être décrite) (Pediocin-like).

➤ **Sous-classe IIb :**

➤ Elle comprend les bactériocines à deux peptides pour avoir une activité optimale.

➤ Deux types de bactériocines de classe IIb peuvent être distingués:

- **Type E (Enhancing)** où uniquement l'un des deux peptides est actif seul, mais la présence du deuxième peptide augmente considérablement l'action du premier (Entéroccine L50A/L50B).

Ces peptides peuvent également être inactifs individuellement; seul un mélange des deux composants permet d'observer une activité antibactérienne (Plantaricine JK).

- **Type S (Synergy)** où les peptides sont actifs individuellement mais leur activité sera maximale quand ils sont ensemble (Lactococcine G et Q).

NB: Certains lantibiotiques peuvent avoir un effet synergique une fois ensemble mais le terme de « bactériocines à deux peptides » est réservé à celles dont les gènes codant pour les deux peptides et la protéine d'immunité, sont localisés sur le même opéron, ce qui est différent du cas des lantibiotiques où chacune des deux bactériocines possède son propre opéron.

- **Sous-classe IIc** : cette sous classe contient les bactériocines cycliques comme la Circularine A

c) Classe III :

- Cette classe regroupe les bactériocines thermolabiles à l'exception de la propionicine SM1 et ayant un haut poids moléculaire (> 10 kDa).
- Plusieurs auteurs comme **Cotter *et al.* (2005b)** ne considèrent pas ces composés comme des bactériocines mais des enzymes bactériennes douées d'une activité lytique, ils les ont appelées « bactériolysines ».

d) Classe IV :

- Cette dernière classe est dédiée aux protéines requérant une partie carbohydratée non protéique (lipidique, polysaccharidique) pour avoir une activité antibactérienne comme la Plantaricine S.
- Cependant, l'existence de telles bactériocines est très contestée par plusieurs auteurs comme **Nes *et al.* (1996)** et **Cleveland *et al.* (2001)**.
- Cette classe est très peu représentée voire éliminée des classifications ultérieures (**Cotter *et al.*, 2005b; Drider *et al.*, 2006**).

➤ **Cotter *et al.* (2005b)** ont proposé une modification radicale de la classification de **Klaenhammer (1993)**. Ils ont classé les bactériocines des bactéries Gram positif en seulement deux classes:

- ❖ les lantibiotiques (subdivisée en 11 sous classes selon la séquence des acides aminés du pré-peptide non modifié)
- ❖ les non lantibiotiques (subdivisée en quatre sous classes : IIa, IIb, IIc et IId).

NB. Les protéines ayant une activité hydrolytique sur la paroi (classe III) sont déplacées dans une nouvelles classe d'antibactériens appelée « bactériolysines » parce qu'elles ne sont plus considérées comme des bactériocines mais des enzymes protéolytiques douées d'activité antibactérienne.

Cette classification ne prend en compte que les bactériocines dont l'activité antimicrobienne, la structure et le mode d'action sont bien connus.

III Mécanisme d'action des bactériocines

*** Bactériocines des bactérie à Gram négatif**

- Membrane cytoplasmique
- Ribosome (nécessite le passage à travers la membrane)
- ADN gyrase (nécessite le passage à travers la membrane)

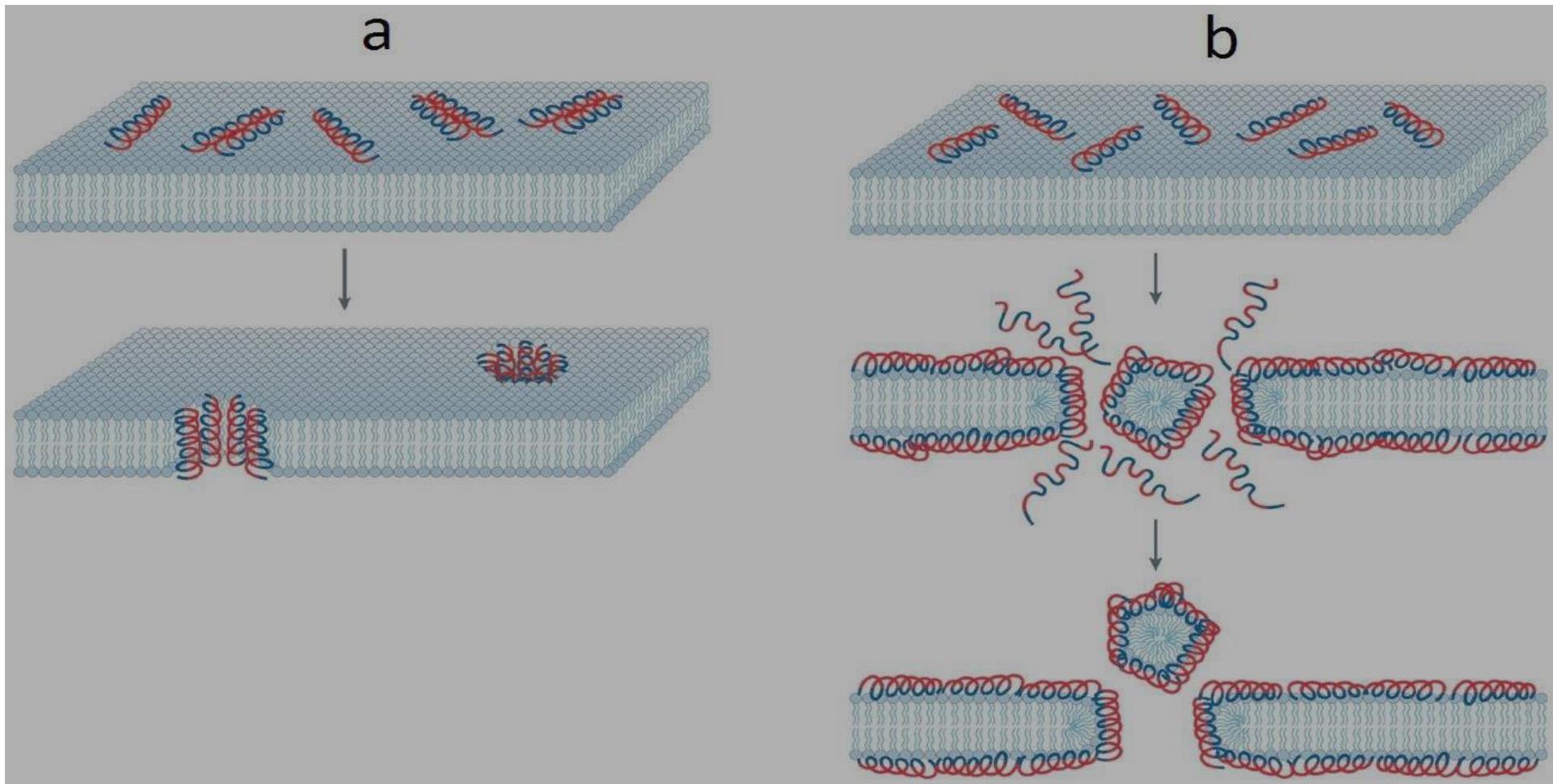
*** Bactériocines des bactérie à Gram positif**

- Membrane cytoplasmique
- Paroi

Bactériocines des bactérie à Gram +

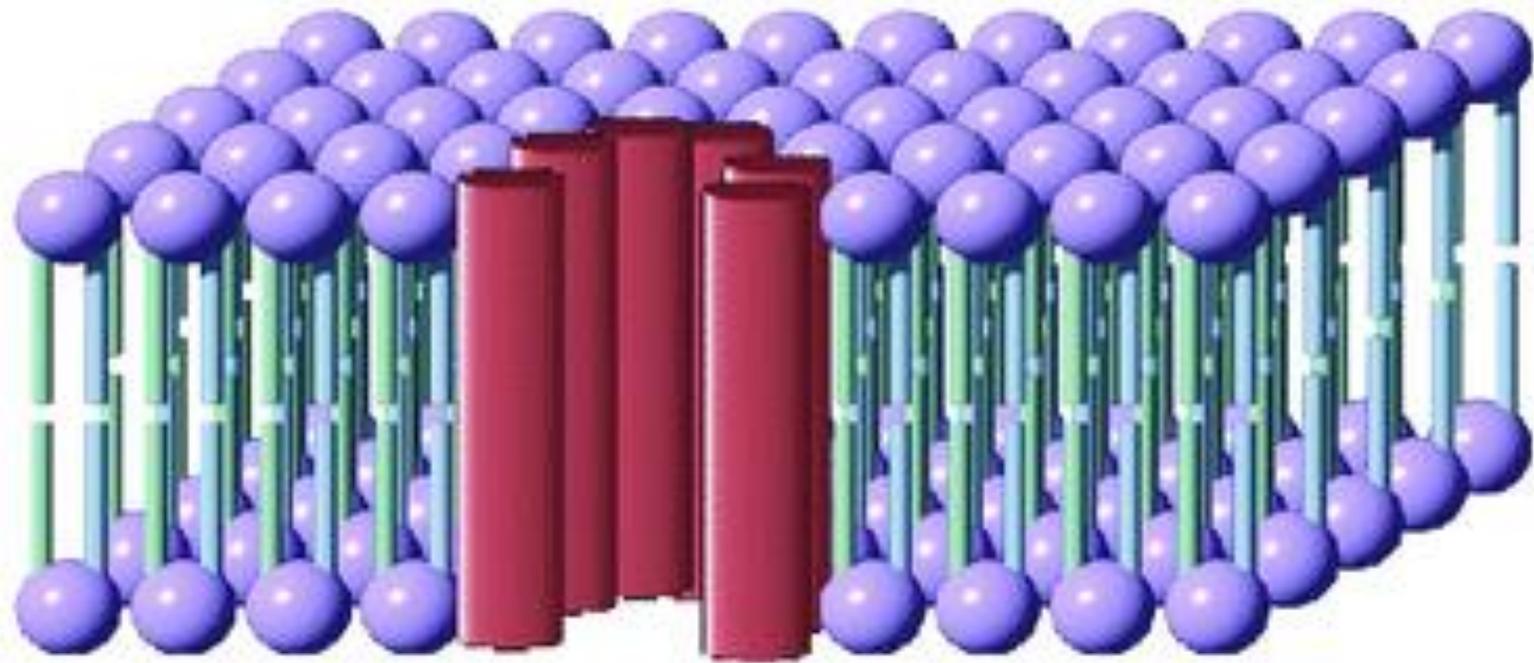
- **Observation**
 - Fuite des ions, et de l'ATP
 - Dissipation de la force proton motrice

- **Conception de model**
 - Carpet (Tapis)
 - Barrel-stave (barreaux de tonneau)



Formation de pores par la Nisine selon les modèles " Barrel-stave " et " Carpet ".

a : modèle " Barrel-stave ", **b** : modèle " Carpet « (petits polypeptides) (**Brogden, 2005**).



Barrel-stave (barreaux de tonneau)

Mécanisme d'action des lantibiotiques

Interaction avec le lipide II:

- **Avec Formation de pores**
- **Sans formation de pores**

Interaction avec le lipide II et formation de pores:

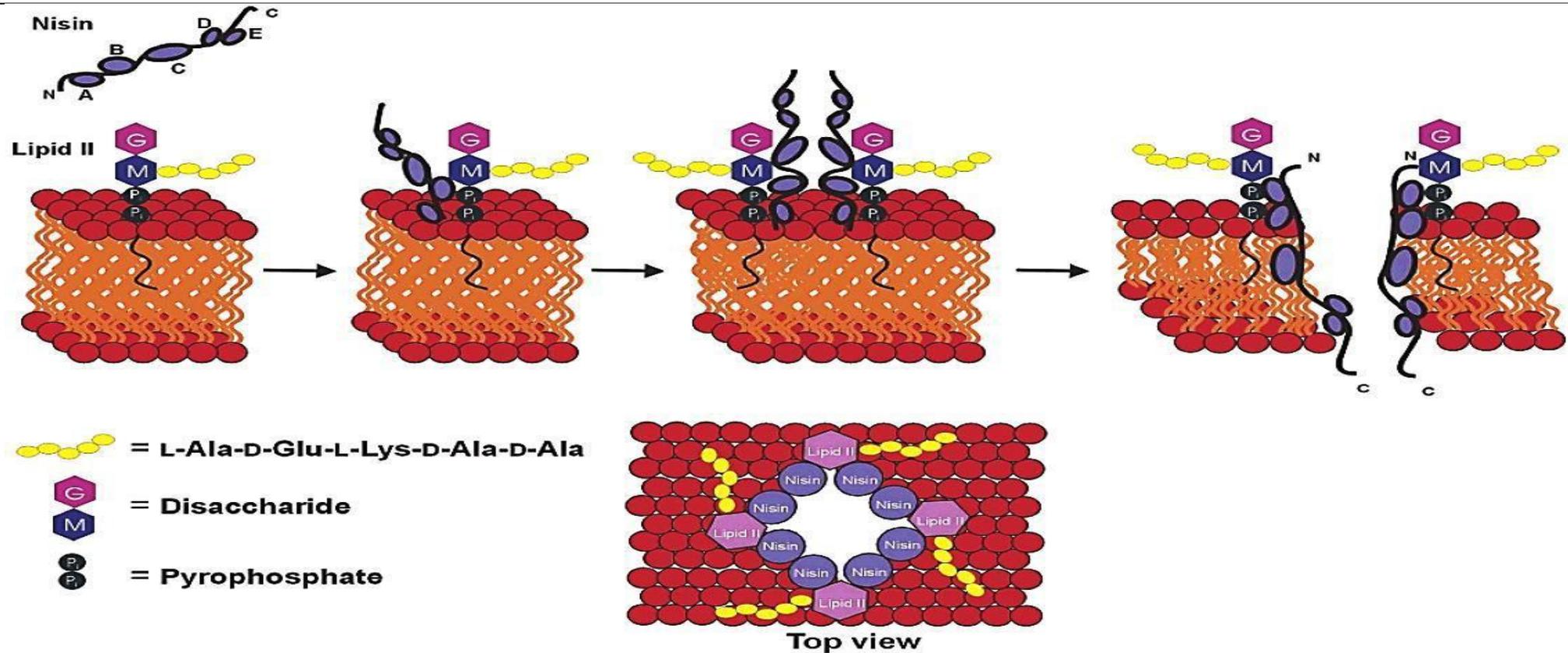


Fig. 5. Le model proposé pour la formation de pores par interaction avec le lipide II : la région N-terminale de la nisine se fixe sur le lipide II et la région C-terminale s'enfonce profondément dans la membrane. Le pore est formé par l'assemblage de 4 molécules de Lipide II et 8 molécules de nisine. Cette arrangement reste spéculatif car l'architecture exacte du pore est mal connue (**Chatterjee *et al.*, 2005**)

Interaction avec le lipide II sans formation de pores

- Cas de l'Epidermine (un lantibiotique de courte chaîne peptidique ne lui permettant pas de traverser la membrane cytoplasmique des cellules cibles)

- Une Variante de nisine tronquée ayant une activité antibactérienne mais elle est incapable de dissiper le potentiel électrique de la membrane (**Rink *et al.*, 2007b**).

- Ces bactériocines inhibent la synthèse de la paroi par formation d'un complexe avec le lipide II et constitue une barrière physique empêchant la transpeptidation et la transglycosylation, deux étapes importantes pour la synthèse de la paroi cellulaire (**Wiedemann *et al.*, 2006a**).

Autres mécanismes d'action

- Inhibition de la biosynthèse de la paroi cellulaire:
 - Exemple: La nisine induit une autolyse des cellules sensibles de *Staphylococcus simulans*, provoquée par une dégradation de la paroi cellulaire. Ce lantibiotique est capable de relâcher deux enzymes hydrolysant la paroi cellulaire :
 - *La N-acétylmuramoyl-L-alanine amidase
 - *La N-acétylglucosaminidase

Mécanisme d'action des bactériocines de la Classe II.

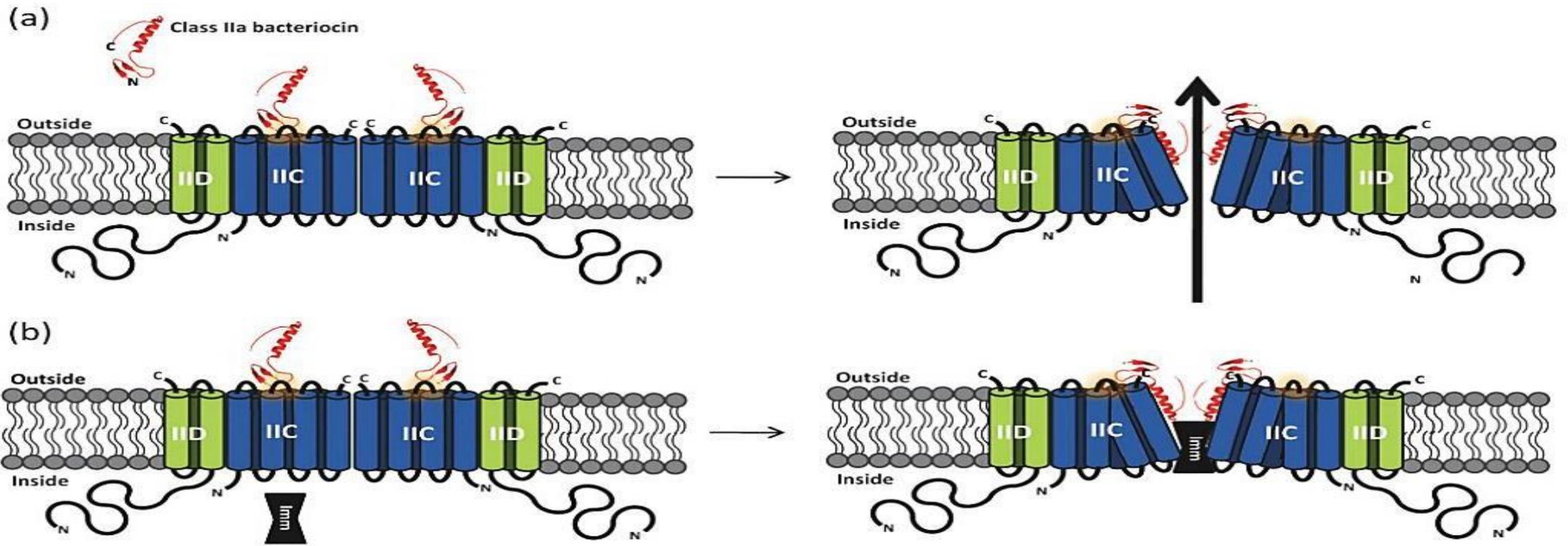
- spectre d'activité assez étroit, comparées aux lantibiotiques
- elles sont principalement dirigées contre les bactéries Gram positif
- agissent par formation de pores ou par interférence avec l'intégrité de la membrane cytoplasmique des bactéries sensibles
- des bactériocine sous-classes IIa ont un mécanisme +/- bélucidé

Les bactériocines des sous-classes IIa

- sous-classe IIa: Actives notamment contre les souches de *Listeria ssp.*, et également contre d'autres bactéries Gram positif comme *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* et *Clostridium*,
- Elles sont bactéricides qui agissent par perméabilisation de la membrane des microorganismes sensibles par formation de pores

- contrairement aux lantibiotiques, aucune fuite d'ATP ne semble être provoquée par ces bactériocines
- Toutefois une baisse de l'ATP intracellulaire est observée, ceci est peut être dû à une consommation accélérée de l'ATP

- bactériocines de la sous-classe IIa ont besoin d'un récepteur spécifique sur la membrane des cellules sensibles pour être actives à faible concentration: **Mannose phosphotransferase (Man-PTS)**

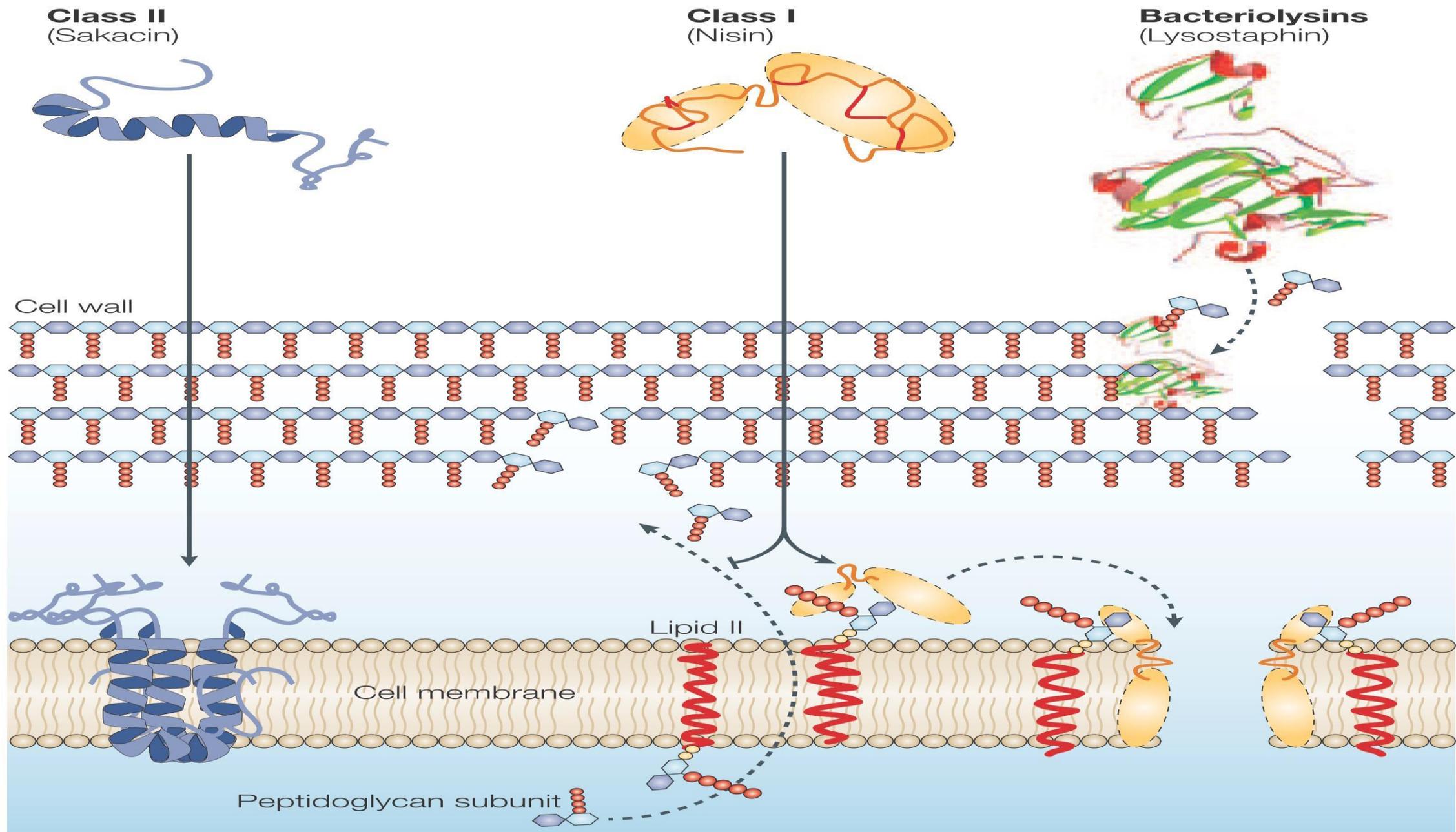


Modèle du mécanisme d'action (a) et d'immunité (b) pour les bactériocines de la sous-classe IIa. (a) la région N-terminale de la bactériocine (rouge) interagit avec une boucle extracellulaire de la sous-unité IIC du Man-PTS. Ensuite la région C-terminale de la bactériocine s'engage dans des interactions spécifiques avec cette sous-unité transmembranaire, en lui causant des changements conformationnels, ce qui provoque la formation du pore et éventuellement la mort cellulaire. (b) chez la bactérie productrice, la bactériocine provoque les mêmes changements conformationnels, mais le pore est bloqué par une protéine spécifique d'immunité (noire) qui se lie hermétiquement au Man-PTS (Kjos *et al.*, 2011).

- Malgré la petite taille des pores créés par ce groupe de bactériocines, la conséquence de la formation de ces pores est létale pour la cellule cible:
 - a) Fuite d'ions comme le potassium, impliquant une modification ou une dissipation de la force protomotrice (dysfonctionnement de certaines enzymes membranaires dépendantes de cette force, comme le système de mannose phosphotransférase sous l'action de la pédiocine JD et de la leucocine S) ou le système du transport actif de certains acides aminés tels que le glutamate, la lysine et la leucine sous l'action de l'acidocine 8912 et la mésentéricine Y105

Mécanisme d'action des bactériocines de la Classe III

- Activité peptidolytique sur les tétrapeptides des peptidoglycanes permettant la dégradation de la paroi de la cellule cible
- Exemple de l'Enterolysine A qui a, dans sa région N-terminale, une activité « endopeptidase-like ».



IV. Applications des bactériocines des bactéries lactiques

- **Bioconservateurs:**

- Résistance aux variations de pH

- aux traitements thermiques

- Elles peuvent cibler sélectivement des bactéries pathogènes ou d'altération

sans inhiber les bactéries indispensables qui leur permet de résister aux

conditions de traitements thermiques des produits laitiers ainsi que leur pH acide.

- Les bactériocines peuvent être utilisées sous une forme:
 - purifiée,
 - semi-purifiée
 - un concentré obtenu après fermentation d'un produit alimentaire
- Les bactéries productrices peuvent également être utilisées dans les produits alimentaires, où la bactériocine sera produite *in situ*.

- Les bactériocines purifiées ou semi-purifiées sont considérées comme un additif alimentaire (d'un point de vue législatif) .
 - Jusqu'à présent, seules la nisine (E234) et la pédiocine PA1/AcH, sont acceptées comme additifs alimentaires

- Une autre application des bactériocines consiste en leur immobilisation sur des supports comme la cellulose et le polyéthylène. La bactériocine sera alors libérée dans le produit au cours de la conservation

Exemple:

Des emballages en polyéthylène contenant des bactériocines ont été développés. Ces emballages permettent de réduire la croissance des microorganismes pathogènes ou indésirables pouvant se développer en surface durant la conservation du produit

- L'utilisation des bactéries productrices de bactériocines est intéressante du point de vue législatif et économique. Elles peuvent être utilisées comme culture protectrice dans les produits fermentés.

- Dans ce cas, la bactérie productrice de bactériocines doit pouvoir produire sa bactériocine dans les conditions de fermentation (température, pH et nutriments), en même temps elle ne doit pas détériorer les qualités organoleptiques du produit et la bactériocine produite ne doit pas avoir d'activité contre les autres bactéries lactiques en association

- Cependant, cet aspect doit être étudié en détail parce que plusieurs facteurs sont limitants lors d'une application alimentaire:

a) La composition du produit peut réduire ou dissiper l'activité de la bactériocine à cause de l'adsorption de cette dernière sur des composantes du produit, ce qui limite sa solubilité et sa diffusion

- B) Le pH inapproprié, le traitement thermique appliqué au produit et/ou la température de stockage constituent un autre facteur pouvant limiter l'activité inhibitrice dans un produit alimentaire

- C) Un autre facteur limitant l'activité des bactériocines est la flore autochtone de l'aliment produisant des protéases pouvant dégrader la bactériocine

Thérapeutique

- Des expérimentations *in vivo* sur des animaux de laboratoire ont montré l'efficacité de certains Lantibiotiques dans le traitement de certaines maladies fonctionnelles. La fibrose kystique (appelée aussi la mucoviscidose) est une maladie due à une modification de la conductance transmembranaire à cause d'un dysfonctionnement des canaux de transport de l'ion chlorure (Cl^-) au niveau des cellules épithéliales.

- La Duramycine appelée aussi Moli190 est un Lantibiotique capable de se lier à un phospholipide de la membrane cellulaire (le phosphatidylethanolamine) et induire un changement du taux de calcium intracellulaire, ce qui conduit à l'activation des canaux de chlorure calcium-dépendant

- L'activation de ces canaux alternatifs de chlorure provoque la sortie de ce dernier avec l'eau dans le milieu extracellulaire, ce qui augmente la conductance transmembranaire et compense ainsi le dysfonctionnement des canaux de transport de chlorure chez les patients souffrant de cette maladie.

- L'inhalation de la Moli1901 chez ces patients améliore beaucoup les fonctions pulmonaires

- Avec le même mécanisme, ce Lantibiotique trouve une autre application potentielle le traitement du syndrome de sécheresse oculaire ou xérophtalmie (affections oculaires dues à la diminution de l'hydratation naturelle des yeux chez les personnes âgées)

- De plus, en se fixant sur la phosphatidyléthanolamine, qui est le récepteur membranaire de la phospholipase A2, ce lantibiotique inhibe cette enzyme impliquée dans les réponses inflammatoires et allergiques, ce qui ouvre la voie devant son utilisation comme un anti-inflammatoire

- **Synergie avec les antibiotiques:**
- une molécule hybride composée de la vancomycine et les 12 premiers acides aminés N-terminaux de la nisine restaure l'activité de cet antibiotique contre les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV)
- l'association de la pédiocine PA-1 à la polymyxine E a un effet inhibiteur important sur *L. monocytogenes* et *E. coli* résistants à la polymyxine E

- L'injection intramammaire de la Nisine et de la lysostaphine chez des vaches laitières atteintes de mammite, assure une guérison de 66% des cas pour *Staphylococcus aureus*, 95% des cas pour *Streptococcus agalactiae* et 100% des cas pour *Streptococcus uberis*

- la Mersacidine inhibe la croissance de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthiciline (SARM) chez des souris immunodéprimées atteintes de rhinite. Elle inhibe la synthèse de la paroi chez les bactéries d'une efficacité égale à celle de la vancomycine. Elle est active aussi contre *Propionibacterium acnes*

- L'epidermine, la gallidermine et la lacticine 3147 présentant une activité antibactérienne contre des SARM et des ERV, ont prouvé leur efficacité dans le traitement des infections cutanées

- la nisine et la Lacticine 3147 sont utilisées comme agents antibactériens dans des produits de nettoyage et de protection des mamelles pour lutter contre les mammites chez les vaches laitières. Ces produits sont commercialisés aux Etats Unis sous forme de lingette appelées Wipe Out[®] (ImmuCell) pour la nisine et sous forme d'infusions intra-mammaires appelées TeatSeals[®] (Cross Vetpharm Group, Ltd) pour la Lacticine 3147

- la Nisine est additionnée à certaines lotions utilisées comme bain de bouche pour traiter la gingivite et prévenir les caries dentaires
- BLIS K12 est le nom commercial d'un produit cosmétique contenant une souche de *Streptococcus salivarius* qui produit la Salivaricine A2 et B *in situ* et inhibe la croissance de *Streptococcus pyogenes* responsable de la pharyngite et associées à la mauvaise haleine
- Les firmes Astra et Merck ont commercialisé la nisine pour traiter les ulcères gastriques dus à *Helicobacter pylori*.

- Plusieurs infections bactériennes sont provoquées par des implants biomédicaux infectés. **Bower *et al.* (2002)** ont démontré que des cathéters en Téflon et des tubes de trachéotomie en plastique traités par la nisine (revêtus de nisine) et insérés dans les veines et les trachées des animaux permettent de contrôler les infection dues à *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* et *Enterococcus faecalis*.

- Des rapports sur l'utilisation thérapeutique des bactériocines de la sous-classe IIa comme la pédiocine PA-1 et la piscicoline 126 ont été publiés. La pédiocine PA-1 purifiée offre une protection anti-*Listeria monocytogenes* une fois administrée par voie orale chez des souris

- Une fois ajoutée à l'eau de boisson, la bactériocine OR-7 purifiée réduit remarquablement le compte fécal de *Campylobacter jejuni* chez les poulets artificiellement infectés.

- Les travaux menés sur l'enterocine CRL 35 et l'enterocine ST5H ont montré que ces deux bactériocines sont douées d'activité antivirale à l'égard des virus de l'herpès, HSV-1 et HSV-2.

Les antibiotiques

Les antibiotiques

Un antibiotique (du grec *anti* : « contre », et *bios* : « la vie ») est une molécule naturelle ou synthétique qui détruit ou bloque la croissance des bactéries. Dans le premier cas, on parle **d'antibiotique bactéricide** et dans le second cas **d'antibiotique bactériostatique**. Un même antibiotique peut être bactériostatique à faible dose et bactéricide à dose plus élevée. Un grand nombre d'antibiotiques sont des molécules naturelles, fabriquées par des micro-organismes: des champignons ou d'autres bactéries. Ces dernières les produisent pour éliminer les bactéries concurrentes avec lesquelles ils sont en compétition dans leur biotope.

Les antibiotiques

Les antibiotiques agissent de manière spécifique sur les bactéries, en bloquant une étape essentielle de leur développement: synthèse de leur paroi, de l'ADN, des protéines,, etc.. Il existe aussi d'autres molécules actives sur ces autres types d'agents infectieux que l'on appelle des antifongiques ou des antiviraux et qui sont distincts des antibiotiques.

Seul un petit nombre des antibiotiques naturels est utilisable en thérapeutique humaine, pour des raisons de disponibilité dans l'organisme ou d'effets indésirables. Un grand nombre de molécules aujourd'hui sur le marché sont des molécules de synthèse, dérivées ou non d'antibiotiques naturels, en particulier pour contourner les problèmes de résistance.

Les antiseptiques ne sont pas des antibiotiques. Leur fonction est de tuer un maximum de germes (bactéries, champignons, virus), leur mode d'action n'est pas spécifique, ils ne s'utilisent que localement en application externe et mal employés (trop concentrés par exemple).

Les antibiotiques



Classification des antibiotiques

Ces molécules naturels sont classées selon leur origine, nature chimique, mécanisme d'action et spectre d'action, on distingue:

Les Béta lactamines

(dérivés de deux acides aminés): il s'agit de bactéricides à faible toxicité (ex: Pénicilline, Céphalosporines ...).

Les Aminosides

(oligosaccharides aminés): il s'agit de bactéricides ayant une toxicité sur le rein et l'oreille interne (ex: Streptomycine, Gentamycine...).

Les Macrolides

il s'agit de bactériostatiques à faible toxicité (ex: Erythromycine, Spiramycine...).

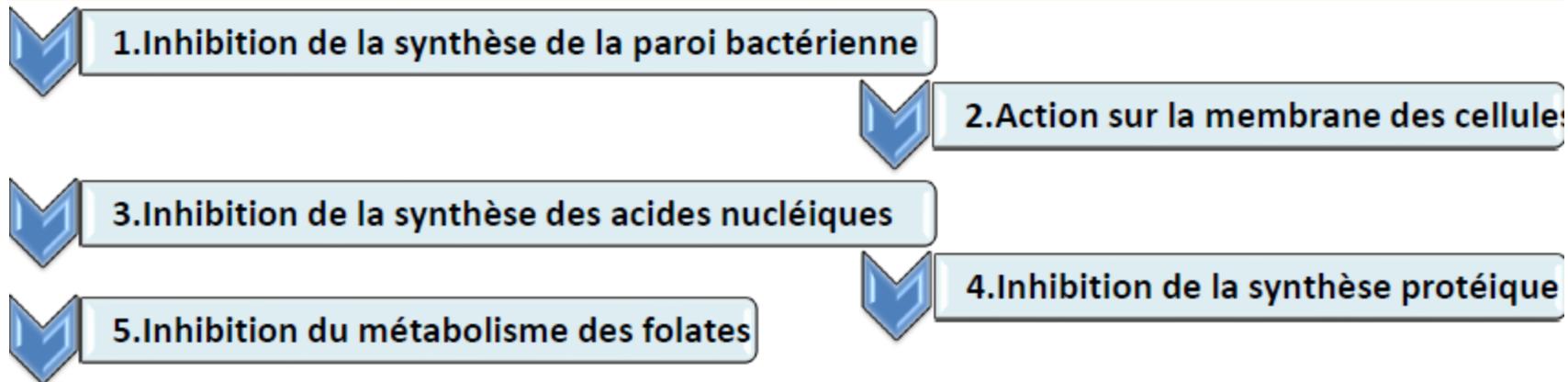
Les antibiotiques



Le mode d'action

Le principe d'action des antibiotiques consiste à bloquer sélectivement une étape d'un mécanisme essentiel à la survie ou à la multiplication des bactéries. Le mécanisme ciblé par l'antibiotique est le plus souvent spécifique des bactéries et n'a pas d'équivalent chez les eucaryotes et en particulier chez l'homme.

L'activité bactérienne s'exerce à l'échelon moléculaire au niveau d'une ou de plusieurs étapes métaboliques. Les antibiotiques agissent soit sur une cible unique, soit sur de multiples cibles à la fois.



Les antibiotiques



Le mode d'action

Inhibition synthèse paroi bactérie	
Béta-lactamines	bactéricide
Glycopeptides	bactéricide
Fosfomycine	bactéricide
Inhibition synthèse ou fonctionnement ADN	
Fluoroquinolones	bactéricide
Nitro-imidazolés	bactéricide
Inhibition synthèse protéique	
Aminosides	bactéricide
Acide fusidique	bactériostatique
Cyclines	bactériostatique
Macrolides	bactériostatique
Destabilisation membrane	
polypeptides	bactéricide

Les antibiotiques



Production

Les antibiotiques peuvent être obtenus par fermentation ou alors par hémisynthèse. Ex: l'ampicilline

L'hémisynthèse a pour but de fournir de nouveaux produits pour remplacer ceux qui sont devenus inactifs du fait des résistances opposées par certains bactéries. (suite à l'usage intempestif en thérapeutique humaine).

Antibiotiques	Micro-organismes producteurs
Aminosidine	<i>Streptomyces sp.</i>
Gentamycine	<i>Micromonospora purpurea</i>
Pénicilline	<i>Penicillium sp</i>
Polymyxine B	<i>Aerobacillus polymyxa</i>
Tétracycline	<i>Streptomyces aureofaciens</i>
Erythromycine	<i>Streptomyces erythreus</i>

Les antibiotiques



Production de pénicilline

Pénicilline peut être produit par de nombreuses espèces de *Penicillium* (dont *P. notatum*), ainsi que celles appartenant au genre *Aspergillus*.

Les milieux de culture industriels (pH après stérilisation = 6) contiennent:

- ✓ Une source d'azote: le Corn Steep (3.5 %).
- ✓ Pour la croissance et production: du lactose (3.5%) et du glucose (1%).
- ✓ Pour l'effet tampon: du carbonate de calcium (1%) et du phosphate monopotassique (0.4%).

Il est souvent rajouté à ce milieu, des silicones (huiles végétales) utilisés comme source d'énergie et surtout comme agents tensio-actifs anti-mousses.

Famille	Groupe	Antibiotique
B lactamines	Pénicilline G pénicillines M pénicillines A Céphalosporines	benzylpénicilline. méticilline, l'oxacilline , cloxacilline Ampicilline, amoxicilline Cefalixine,cefazonile,ceftiofur,cefquinone Cefuroxime,cefoperazone,cefalonium
Aminosides	Gentamicine apramycine Spectinomycine néomycine framycetine	
phenicoles	Florfenicol, thiamphenicole	
tétracyclines	Oxytetracycline, chlortetracycline doxycycline	
macrolides	Tylosine, spiramycine, érythromycine	
polypeptides	Bacitracine, colistine	
Quinolones	Flumequine, enrofloxacin, marboflaxacin, danofloxacin	
sulfamides		Sulfadiazine,sulfadimidine,sulfadimenthoxine Sulfadoxine,sulfamethoxyypyridazine
Autre antibiotique	Lincomycine,novobiocine,sifaximine	

Site d'action de l'antibiotique	Classe d'antibiotique	Origine	Première utilisation	Exemple
Paroi bactérienne	Betalactamines	Naturelle	1941	Penicilline G
	Glycopeptides	Naturelle	1956	Vancomycine
	Fosfomycines	Naturelle	1969	Fosfomycine
Membrane cytoplasmique	Polymixines	Naturelle	1942	Colistine
	Lipopeptides	Naturelle	2003	Daptomycine
Ribosome	Aminoglycosides	Naturelle	1944	Streptomycine
	Phénicolés	Naturelle	1949	Chloramphenicol
	Tétracyclines	Naturelle	1950	Tétracycline
	Macrolides	Naturelle	1952	Erythromycine
	Lincosamides	Naturelle	1952	Lincomycine
	Streptogramines	Naturelle	1952	Virginiamycine
	Acide fusidique	Naturelle	1963	Acide fusidique
	Acides pseudomoniques	Naturelle	1985	Mupirocine
	Oxazolidinones	Synthétique	2000	Lynézolide
	Pleuromutiline	Naturelle	2007	Retapamuline
ADN/ARN	Novobiocines	Naturelle	1956	Novobiocine
	Ryfamycines	Naturelle	1957	Rifamycine
	Nitroimidazoles	Synthétique	1959	Tinidazole
	Quinolones	Synthétique	1962	Acide nalidixique
Autres : Synthèse de l'acide folique	Sulfonamides	Synthétique	1935	Sulfadiazine
	Diaminopyrimidines	Synthétique	1968	Trimethoprime