
SYNTHESE CHIMIQUE DE LA LACTOCOCCINE B ET EVALUATION FONCTIONNELLE DE SON EXTREMITÉ N-TERMINALE GRACE A UN ANALOGUE SYNTHETIQUE TRONQUÉ

S. LASTA ^{1,2*}, Z. FAJLOUN ³, P. MANSUELLE ^{1,4}, J.M. SABATIER ⁵,
A. BOUDABOUS ² ET F. SAMPIERI ⁵

¹ Laboratoire de Biochimie, CNRS FRE 2738, Faculté de Médecine Nord, Bd Pierre Dramard, 13916 Marseille Cedex 20, France.

² Laboratoire Microorganismes et Bio-molécules Actives, Département de Biologie, Faculté des Sciences de Tunis, Université El Manar, 2092, Tunis, Tunisie.

³ Laboratoire Cellpep S.A, 13-15 Rue Ledru-Rollin, 13015 Marseille, France / Université Libanaise, Faculté des Sciences, Section III, Tripoli, Liban.

⁴ CNRS-UPR2589, Institut de Biologie Structurale et Microbiologie (IBSM, Parc Scientifique de Luminy, Case 934, 13288, Marseille cedex 09, France.

⁵ Laboratoire ERT 62 «Ingénierie des Peptides à Visée Thérapeutique», Université de la Méditerranée - Ambrilia Biopharma S.A, Faculté de Médecine Nord-Bd Pierre Dramard, 13916 Marseille Cedex 20, France.

* Auteur correspondant: E-mail: lasta_samar@yaboo.fr

RESUME

La lactococcine B (LnB) est une bactériocine de 47 résidus d'acides aminés, hydrophobe et positivement chargée. Produite par la souche *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* 9B4, elle est active exclusivement sur les lactocoques. Afin d'étudier son activité biologique, nous avons produit la lactococcine B synthétique (LnBs), obtenue par synthèse chimique en phase solide selon la stratégie Fmoc, qui s'est avérée conforme au peptide naturel. Afin d'obtenir l'analogue (7-47)LnBst, tronqué et délété des résidus 1 à 6 du côté N-terminal, un prélèvement de la peptidyl-résine a été réalisé après la 41^{ème} étape de l'assemblage de LnBs. L'analogue (7-47)LnBst ainsi produit ne montre aucune activité antibactérienne sur les souches indicatrices. Ce résultat suggère fortement que la partie N-terminale de LnB, particulièrement les six premiers acides aminés, se révèle essentielle dans l'activité de cette bactériocine.

SUMMARY

The lactococcin B (LnB) is a hydrophobic, positively charged bacteriocin, produced by *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* 9B4. It consists of a peptidic chain made up of 47 amino acid residues, and inhibits *Lactococcus* exclusively. In order to study its biological activity, a synthetic lactococcin B (LnBs) was obtained by solid-phase chemical synthesis using a Fmoc strategy. LnBs was shown to be indistinguishable from the natural peptide. In addition, a synthetic (7-47)LnBst analogue was obtained by withdrawal of peptidyl-resin after the 41 cycle of LnBs peptide chain assembly. The synthetic N-terminal truncated (7-47)LnBst analogue was found to be inactive on indicator strains. Our results strongly suggest that the first six N-terminal amino acid residues are involved in the bactericidal activity of LnB.

Mots clés: Bactériocines, lactococcine B, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, synthèse peptidique, analogues peptidiques tronqués.

Key words: Bacteriocins, lactococcin B, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, chemical peptide synthesis, truncated peptide analogues.

INTRODUCTION

Les bactéries lactiques sont connues pour leur aptitude à produire différents composés antibactériens, qui leur permettent, selon toute vraisemblance, de se développer préférentiellement dans divers écosystèmes¹. Parmi les substances synthétisées figurent les bactériocines, de nature protéique^{2, 3, 4, 5, 6, 7}. Ces dernières font l'objet d'une attention toute particulière, depuis une dizaine d'années, en raison de l'intérêt, tant fondamental qu'appliqué, qu'elles suscitent dans le domaine de la protection contre les infections bactériennes. Produites par plusieurs espèces, leur spectre d'action est plutôt étroit, limité aux espèces taxonomiquement proches du producteur, mais il s'étend quelquefois vers des bactéries plus éloignées^{8, 9}. Etant donné qu'elle est dotée d'une immunité, la souche productrice se protège contre sa propre bactériocine en synthétisant une protéine qualifiée 'de protéine immunité'¹⁰. Une fois synthétisées, les bactériocines se retrouvent dans le milieu extracellulaire via un mécanisme mettant en jeu des molécules spécifiques. L'analyse des déterminants génétiques de ces bactériocines montre, dans la plupart des cas, la présence d'un gène de transport de type ABC, associé à un gène codant une protéine accessoire¹¹. Leur structure primaire a permis de définir trois classes se distinguant par la taille et par le fait que ces bactériocines ont subi ou non des modifications post-traductionnelles. La classe I comporte des petites bactériocines, les lantibiotiques, trouvés non seulement chez les bactéries lactiques, mais également chez de nombreuses autres bactéries à Gram positif. Ces bactériocines comportent un nombre variable d'acides aminés modifiés, tels que les lanthionines et les méthyllanthionines. Les prototypes sont les nisines A¹² et Z¹³ produites par *Lactococcus lactis*, ou encore la lacticine 481¹⁴. La classe II comprend une plus grande variété de structures, ce qui a rendu nécessaire la création de plusieurs sous-groupes^{15, 16}. Les bactériocines de la sous-classe IIa possèdent en commun, d'une part, d'être de taille réduite (masse moléculaire inférieure à 10 kDa) et, d'autre part, de posséder une activité anti-*Listeria*, à l'instar de la Pédicocine PA-1¹⁷, la plus anciennement connue. Grâce à la détermination de certaines de leurs séquences, il a été mis en évidence un motif structural commun à toutes les bactériocines appartenant à cette classe. Il s'agit de l'enchaînement d'acides aminés suivant:

YGNGVXC (où X est un acide aminé quelconque), localisé au voisinage de l'extrémité NH₂.

Les bactériocines de la sous-classe IIb ont pour trait commun la nécessité de l'association de plus d'un peptide pour constituer un ensemble biologiquement actif. La lacticine F, ainsi que diverses lactococcines, entrent dans cette catégorie¹⁸.

Les bactériocines de la sous-classe IIc, moins étudiées que les précédentes, comprennent les bactériocines activées par les thiols, comme la lactococcine B¹⁹, tandis qu'entrent dans la sous-classe IId toutes les bactériocines non apparentées aux précédentes, à l'instar de la divergicine A²⁰. La classe III a été créée pour rassembler les bactériocines de taille supérieure à 10 kDa, comme l'helvéticine J²¹. Le mode d'action des bactériocines a été analysé et différents modèles ont été proposés pour expliquer la perforation des membranes des cellules-cibles de ces bactériocines lactiques, qui paraissent, en général, agir de façon similaire²².

La lactococcine B (LnB) est une petite bactériocine, produite par la souche *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* 9B4. Elle est non-modifiée de manière post-traductionnelle, plutôt hydrophobe, positivement chargée et représente la classe Iic²³. Cette molécule a fait l'objet de quelques travaux de biologie moléculaire, qui ont abouti, entre autres, à l'identification de ses déterminants génétiques. Pour sa biosynthèse, seulement quatre gènes sont suffisants¹⁹: le gène structural *lcnB*, le gène *lnciB*, qui code pour la protéine d'immunité, et les gènes *lcnC* et *lcnD* qui sont impliqués dans le transport et la maturation du peptide immature.

Tout comme la lactococcine A, bactériocine produite par la même bactérie en même temps que la lactococcine M²⁴, la lactococcine B provoque la perte d'ions, d'acides aminés et de glutamates qui suit la formation de pores. Contrairement à d'autres bactériocines, la formation de ces pores se produit indépendamment du voltage de la membrane. De plus, la taille des pores, bien qu'inférieure à celle des pores produits par les lantibiotiques, est proportionnelle à la concentration de bactériocine dans le milieu²³. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à cette bactériocine LnB dans le but d'une meilleure compréhension de la relation entre sa structure et sa fonction et nous avons procédé à sa production par synthèse peptidique en phase solide (SPPS), stratégie de plus en plus utilisée dans les études des bactériocines^{25, 26}.

Toujours dans cet esprit, nous avons synthétisé également un analogue de LnB, par délétion de quelques résidus d'acides aminés situés à son extrémité N-terminale. Ainsi, nous avons produit une quantité non limitante de la lactococcine B synthétique et de son analogue délété, et déterminé ensuite les propriétés physicochimique et biologique de chaque peptide.

MATERIEL ET METHODES

Matériel

Les acides aminés protégés sur leur fonction amine par le dérivé fluorényl méthoxycarbonyl (Fmoc-AA), la résine 4-hydroxy-méthylphényloxy (HMP) et les réactifs de couplage utilisés pendant l'assemblage de peptide, ont été achetés chez Perkin-Elmer. Les solvants utilisés en chromatographie liquide haute pression, ainsi que l'acide trifluoroacétique (TFA) utilisés pour le clivage de la peptidyl-résine, ont été fournis par SDS (Peypin, France). Les souches *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403²⁷, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SK112 (INRA) et *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 11 454 (ATCC 11 454) sont les bactéries indicatrices qui ont été utilisées dans le présent travail.

Synthèse chimique

La lactococcine B (LnB) comporte 47 résidus d'acides aminés (Figure 1) et possède son extrémité C-terminale non-amidée. Elle a été produite chimiquement par la méthode de synthèse peptidique en phase solide²⁸. La stratégie Fmoc a été adoptée, en utilisant un synthétiseur automatique de peptides (modèle 433A, Applied Biosystems, Foster City, CA, Etats-Unis). La chaîne peptidique a été assemblée par étapes sur 0.25 mmol d'une résine HMP (0.7meq de groupe amine/g), en utilisant 1.0 mmol des dérivés Fmoc-AA²⁹.

Les groupements protecteurs des chaînes latérales des résidus d'acides aminés trifonctionnels étaient : trityl- pour Cys, His et Gln, tert-butyl- pour Ser, Thr, Tyr, Asp et Glu, penta-méthylchroman-

pour Arg, tert-butyloxycarbonyl- pour Lys et Trp.

Tout d'abord, 1.0mmol de Fmoc-histidine a été activé avec 1.5mmol de N,N'-dicyclohexylcarbo-diimide contenu dans 0.5ml de diméthylformamide (DMF), en présence de 0.22mmol de 4-diméthylaminopyridine dans 2.2ml de N-méthylpyrrolidone (NMP), et couplé à 0.25mmol (0.36g) de résine type Wang HMP, fonctionnalisée à 0.7mmol de fonction amine/g. Les éventuels groupes hydroxyles fonctionnels résiduels ont été ensuite bloqués en mettant la résine en présence de 1.0mmol d'anhydride benzoïque en solution dans 2.1ml de NMP, selon Sieber³⁰. L'assemblage des 47 résidus, selon 47 cycles, a été effectué totalement à partir de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale. Chaque cycle d'assemblage d'un AA était constitué des étapes suivantes: déprotection, lavage, couplage, lavage.

Pour chacun des cycles de synthèse suivants, les fonctions N- α -amines ont été déprotégées par l'enlèvement des groupements Fmoc, obtenu par traitement de la résine, d'abord par de la pipéridine à 18 % dans la NMP pendant 3 min, puis à 20 % pendant 8 min. Ensuite, la peptidyl-résine était lavée 5 fois pendant 1min par la NMP et le dérivé FMOC de l'acide aminé suivant (1.0mmol, soit un "excès" théorique de 4 fois), une fois activé, était couplé à la peptidyl-résine, déprotégée sur sa fonction α -amine, pendant 20min sous forme d'un ester activé de l'hydroxybenzotriazole. Le dérivé FMOC activé était obtenu, à chaque étape, par activation par des quantités équimolaires (1.0mmol) d'hexafluoro-phosphatede2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium, et de N,N-diisopropyléthylamine, le tout en solution dans 2.5ml d'un mélange de NMP/DMF (1:5 v/v).

Après enlèvement du groupement Fmoc du résidu en N-terminal, la peptidyl-résine a été séchée complètement et pesée. Une quantité égale à environ 1.2g a été traitée, sous agitation, par un mélange d'acide trifluoroacétique (TFA)/eau/thioanisole/éthanedi-thiol (88:5:5:2 v/v), en présence de 2.0g de phénol, dans un volume final équivalent à 30ml/g de peptide-résine, pendant 25h, à température ambiante.

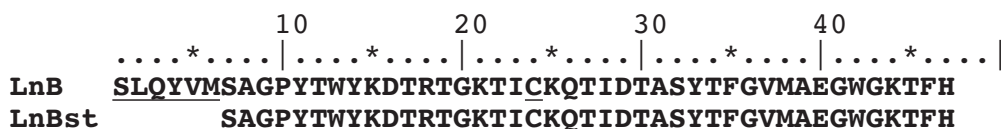


Figure 1. Alignement des séquences de la lactococcine B (LnBs) et de son analogue (LnBst). Le résidu de cystéine 24, ainsi que l'hexapeptide N-terminal SLQYVM, ont été soulignés.

Après la réaction de clivage, le mélange a été ensuite filtré pour enlever la résine, le filtrat a été précipité par l'éther éthylique à 0°C, centrifugé (3000g pendant 10min), et le précipité lavé 3 fois dans le même milieu à froid. Le peptide obtenu au final (950mg) a été dissous dans l'eau et lyophilisé. Six résidus avant la fin de la synthèse et après départ du groupement Fmoc, une partie de la peptidyl-résine (400mg) a été soustrée et soumise directement à la procédure de clivage décrite ci-dessus pour la molécule complète, afin d'obtenir une molécule synthétique de 41 résidus: la LnBst déletée des résidus 1-6 (SLQYVM) ou encore (7-47) LnBst. Une partie de chaque peptide brut synthétique (40mg) a été prélevée et mise à oxyder à l'air pendant 48 heures dans un tampon 0.2 M tris/HCl (pH 8).

Purification et caractérisation physico-chimique des peptides synthétiques

Les peptides bruts ont été repris dans l'eau (50mg dans 20ml) et une partie aliquote de 200 μ l (500 μ g) de chacun des peptides a été prélevée et analysée par CLHP analytique, selon un gradient de 0 à 60 % d'acétonitrile (ACN)/0.1% de TFA, dans l'eau/0.1% de TFA, en 40min. Les profils CLHP analytiques obtenus devaient permettre de prévoir, d'après les temps de rétention observés, quels gradients devaient être utilisés pour une CLHP semi-préparative. Ainsi, selon les profils d'analyses obtenus, nous avons procédé à une purification sur CLHP semi-préparative selon un gradient de 0% à 80 % d'ACN (0.1 % TFA) en 80 minutes. Cela a permis de purifier la quantité totale de la LnBs dissoute au départ dans l'eau. Les échantillons d'intérêt récoltés ont été lyophilisés et analysés par la suite pour vérifier leur homogénéité. Pour cela, des échantillons de la LnBs purifiée et de son analogue structural déleté de son extrémité N-terminale (LnBst) ont été analysés par: (i) CLHP en phase reverse: colonne C18 (Merck, Chromolith RP18, 5 μ m, 100 x 4.6 mm) utilisant un gradient linéaire de 0% à 60% du tampon B [0.08% (v/v) TFA/acétonitrile] dans un tampon A [0.1% (v/v) TFA/H₂O] avec un débit de 1ml/min. (ii) analyse d'acides aminés après hydrolyse acide (6 N HCl/2% phénol (w/v), 20h et 70h, 110°C) effectuée sur un auto-analyseur d'acides aminés 6300 Beckman. (iii) spectrométrie de masse sur spectromètre MALDI-TOF. Les échantillons, de quelques picomoles, ont été déposés entre deux couches de matrice (l'acide cyano-4 hydroxycin-

namique) sur une plaque en acier inoxydable. (iv) séquençage d'Edman utilisant un séquenceur automatique Applied Biosystems 476A.

Caractérisation biologique

Les souches bactériennes ont été mises à croître dans le milieu M17, à 30°C. Les peptides synthétiques LnB et son analogue LnBst ont été testés pour leur activité sur les bactéries indicatrices, par la méthode de diffusion des puits³¹, dont le principe repose sur les propriétés de diffusion des composés antibactériens à travers un milieu gélosé. Dans 20ml de milieu gélosé préalablement ensemencé avec la souche cible, des puits de 6mm ont été creusés à l'aide d'un tube à hémolyse. Dans chaque puits a été déposé 200 μ l de solution peptidique à tester, à différentes concentrations et l'inhibition de croissance du tapis bactérien autour des puits a été observée après 18 h d'incubation à 30°C. La mesure de l'effet de la substance active était définie comme l'inverse de la plus grande dilution montrant une zone d'inhibition de la souche indicatrice. Elle est donc exprimée en unité arbitraire par millilitre (UA/ml).

Prédiction de structures secondaires

La séquence peptidique de la LnB a été soumise à des serveurs web de prédiction de parties non-structurées des protéines: DisEMBL (<http://dis.embl.de/>)³² et GlobPlot (<http://globplot.embl.de/>)³³; ces deux serveurs effectuent ces prédictions selon deux algorithmes indépendants. Par ailleurs, cette séquence a été soumise à une analyse de prédiction de structures secondaires sur le serveur PredictProtein (<http://www.predictprotein.org>)³⁴. Les paramètres par défaut ont été appliqués.

RESULTATS

Synthèse peptidique en phase solide de LnBs et LnBst

• Assemblage

La lactococcine B (LnBs) est un polypeptide à extrémité C-terminale carboxylique, constitué de 47 résidus d'acides aminés et possédant une demi-cystine à la position²⁴. L'analogue structural LnBst présente la séquence primaire de LnB native, tronquée des six premiers résidus du côté N-terminal. Les séquences de LnB et de son analogue (LnBst) sont représentées dans la figure 1. La stratégie Fmoc a été employée pour la synthèse peptidique en phase solide de la bactériocine LnBs et de son analogue LnBst.

La résine HMP, utilisée ici, est couramment employée dans l'assemblage des peptides à extrémité C-terminale de type carboxylique. Elle répond, en effet, aux critères définis par l'équipe de Merrifield³⁵. La réaction d'estérification entre l'HMP et le premier acide aminé (His) a été catalysée par la 4-diméthylaminopyridine (DMAP)³⁶. Cependant, à cause d'un rendement de couplage incomplet toujours observé lors de l'utilisation de cette résine, un blocage des groupements fonctionnels restés libre est nécessaire après l'assemblage du premier résidu d'acide aminé du côté C-terminal. En outre, nous avons systématiquement effectué un double-couplage au niveau de certains résidus d'acide aminés présentant des encombrements stériques importants, tels que Leu, Ile, Met, Tyr, Phe, Trp, Lys, Arg et Gln. L'efficacité de ces doubles-couplages a été régulièrement vérifiée par des tests à la ninhydrine effectués au cours de l'assemblage peptidique. La quantité de peptidyl-résine obtenue à la fin d'assemblage était égale à 1.2g, correspondant à un rendement global d'assemblage estimé à 90%. Au cours de la synthèse de LnBs, un prélèvement de peptidyl-résine a été effectué après l'étape de déprotection du 41^{ème} acide aminé (Ser 7), pour être soumis à la réaction de clivage dans le TFA. La quantité prélevée (400mg) correspondait à la peptidyl-résine du peptide délété de ses résidus 1-6 (SLQYVM) du côté N-terminal, c'est-à-dire à l'analogue (7-47)LnBst.

• Clivage acide

Les peptidyl-résines de LnBs et LnBst ont été traitées par le TFA. Les peptides ont été ainsi libérés du support solide au cours de ce clivage acide, qui repose sur la libération simultanée de la résine et des groupements protecteurs des chaînes latérales par l'acidolyse produite par le TFA, en présence de piègeurs nucléophiles. Les peptides libérés et précipités par l'éther à 0°C sont qualifiés de peptides bruts (950mg de LnBs et 310mg de LnBst). Ceux-ci ont été repris dans l'eau, lyophilisés puis congelés à -20°C.

Purification des peptides synthétiques LnBs et LnBst

Dans le but d'obtenir des molécules LnBs et LnBst homogènes, chacun des peptides bruts a été purifié sur CLHP semi-préparative, afin de les débarrasser des contaminants présents sous forme des peptides délétés, de fragments peptidiques incomplets, ou

encore de fragments peptidiques ayant subi des réactions secondaires au niveau des chaînes latérales des acides aminés trifonctionnels. A cet effet, 50mg de chacun des peptides bruts ont été repris dans 20ml d'eau. La solubilité des peptides a été totale. Un échantillon de 200µl de chacun des peptides synthétiques bruts a été prélevé pour être analysé en CLHP analytique, (voir matériels et méthodes). Les profils obtenus lors de ces fractionnements sur colonne CLHP analytique (Figures 2a et 3a) ont permis de choisir le gradient qui convenait le mieux pour la purification, par CLHP semi-préparative, des solutions de départ des peptides bruts.

Après purification par CLHP semi-préparative, les fractions qui correspondaient aux deux peptides synthétiques (LnBs et LnBst), ont été rassemblées. L'homogénéité de ces fractions a été contrôlée sur CLHP analytique, selon le critère de l'élution d'un pic unique symétrique indiquant la présence d'un seul peptide pur. Les profils d'élution des peptides purifiés sont présentés dans les figures 2b et 3b.

Caractérisation des peptides synthétiques LnB et LnBst

• Caractérisation physicochimique

Les peptides purifiés ont été ensuite analysés par spectrométrie de masse. Cette technique a apporté une confirmation de la pureté des peptides. En effet, pour démontrer sa conformité avec sa contrepartie naturelle, la bactériocine synthétique pure (LnBs) a fait, tout d'abord, l'objet d'une vérification de la masse moléculaire expérimentale qui devrait correspondre à la masse théorique. Celle-ci, calculée à partir de la séquence primaire de la protéine native (LnB), est de 5329.03Da (M+H)⁺. La valeur expérimentale de 5329.12Da (M+H)⁺ (Figure 2c) correspond parfaitement à la masse théorique. Ceci est également le cas du peptide analogue (LnBst) qui témoigne d'une homologie stricte conformité avec ce que l'on attendait. Sa masse expérimentale est de 4607.68 Da (M+H)⁺ (Figure 3c), très proche de la masse théorique de 4607.16 Da (M+H)⁺.

Les compositions en acides aminés de la LnB synthétique et de LnBst sont présentées dans le tableau I. Les résultats montrent que, excepté pour le tryptophane et la cystéine, qui ont été détruits par l'hydrolyse acide, les molécules synthétiques ont une composition semblable à leur composition théorique.

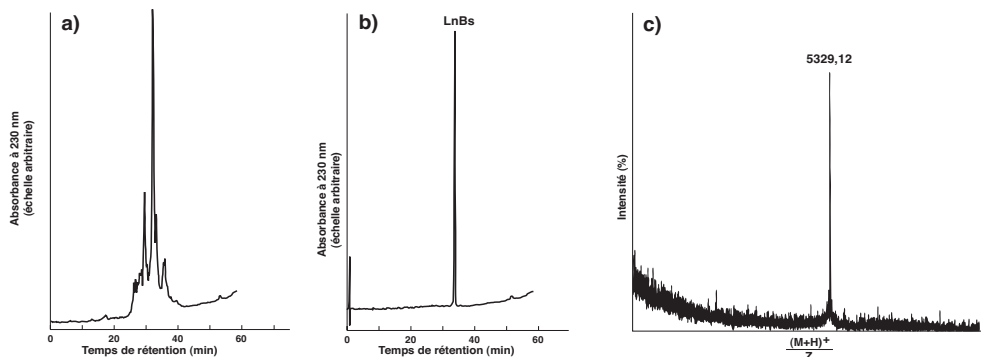


Figure 2. Purification de la lactococcine B synthétique (LnBs). (a) Profil de CLHP analytique du peptide brut (b) Profil de CLHP analytique du peptide purifié (c) Spectre de masse (MALDI-TOF) de LnBs purifiée.

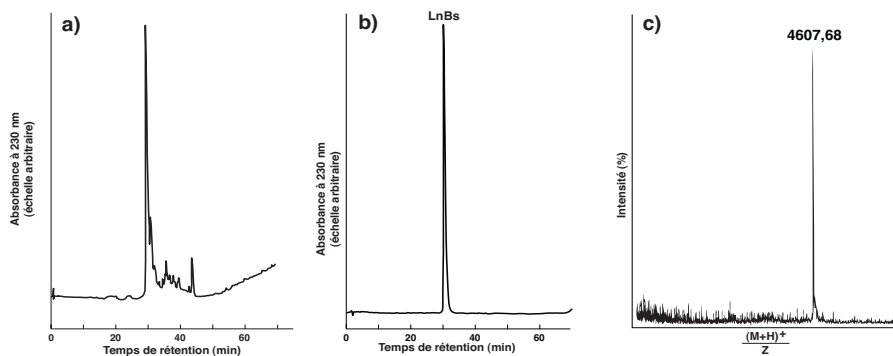


Figure 3. Purification de l'analogue synthétique de la lactococcine B (LnBst). (a) Profil de CLHP analytique du peptide brut (b) Profil de CLHP analytique du peptide purifié (c) Spectre de Masse (MALDI-TOF) de LnBst purifiée.

En complément de ces résultats, le séquençage, selon la méthode d'Edman, d'un échantillon purifié de chacune des molécules synthétiques (résultats non inclus), a permis de confirmer le bon déroulement de l'incorporation des différents résidus d'acides aminés.

• Caractérisation biologique

Nous avons observé que la lactococcine B synthétique est active contre *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403 (Figure 4).

A une concentration de l'ordre du nanomolaire, son activité est de 200UA/ml, alors qu'elle est peu active sur *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SK112 et pas active contre *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454. Le spectre de LnBs reste étroit, en conformité avec les propriétés de la LnB native.

L'ensemble de ces résultats montre que, aussi bien

les propriétés physico-chimiques de LnBs que ses propriétés biologiques sont équivalentes à celles de LnB naturelle, ce qui indique que la bactériocine synthétique est très probablement identique à la molécule naturelle. En revanche, après oxydation, aucune activité biologique n'a été observée par le test sur les bactéries, montrant que cette bactériocine synthétique, une fois oxydée, ne retrouvait pas sa forme biologiquement active (Figure 4).

Le peptide analogue LnBst a montré des propriétés tout à fait différentes de celles de la bactériocine synthétique. Il n'est pas du tout actif sur les bactéries indicatrices, qu'il soit ou non sous sa forme réduite. Ce résultat laisse aussitôt penser à l'importance des résidus manquants dans l'activité de la molécule étudiée. L'ensemble des résultats concernant la fonctionnalité biologique des deux peptides synthétisés est présenté dans la figure 4.



Figure 4. Activité antibactérienne des peptides synthétiques. Puit n°1: peptide LnBs; puit n°2 : peptide LnBs après oxydation; puit n°3: peptide analogue LnBst; puit n°4: peptide analogue LnBst après oxydation. *Lactococcus lactis* ssp.lactis IL1403 est la bactérie indicatrice utilisée.

• Prédiction de structures secondaires

Les deux serveurs, DisEMBL et GlobPlot, ont donné à peu près le même résultat: à part les extrémités N- et C-terminales, qui sont prédites comme pouvant être non structurées (mais ce résultat est normal pour les extrémités de la chaîne peptidique), LnB est prédite comme étant structurée dans son ensemble. De son côté, le serveur PredictProtein prédit que 60% de la séquence se trouverait sous forme de feuillets bêta, 40% sous forme de boucles, et qu'il n'y aurait pas d'alpha-hélice, ce qui va à l'encontre de l'hypothèse avancée par Venema et al.³⁸, selon laquelle une hélice amphipatique se situerait entre les résidus 28 et 46.

Enfin, toujours selon les résultats fournis par ce serveur, la molécule fait très probablement partie des protéines globulaires.

Tableau I: Composition en acides aminés de LnBs et LnBst, en comparaison avec les valeurs théoriques.

Composition en aa.	Peptide LnBs		Peptide LnBst	
	Théorique	Expérimentale	Théorique	Expérimentale
Asp	2	1,9	2	1,9
Thr	8	8,1	8	8,0
Ser	3	2,9	2	2,1
Glu	3	3,2	2	2,1
Pro	1	0,9	1	0,9
Gly	5	5,0	5	4,9
Ala	3	2,9	3	2,9
Cys	1	n.d. ^a	1	n.d
Val	2	1,9	1	1,0
Met	2	2,0	1	1,0
Ile	2	2,1	2	2,1
Leu	1	1,0	0	0,0
Tyr	4	4,1	3	2,9
Phe	2	1,9	2	1,9
His	1	1,0	1	1,0
Trp	2	n.d	2	n.d.
Lys	4	3,8	4	3,9
Arg	1	1,0	1	1,0
Total	47		41	
Masse moléculaire (M+H)⁺	5329,03	5329,12	4607,16	4607,68

a: n.d : non déterminé.

DISCUSSION

Cette étude a été principalement ciblée sur la lactococcine B (LnB), qui nous a semblée une molécule intéressante, car elle est la seule bactériocine à avoir une demi-cystine unique, et qu'elle est, en outre, le modèle représentant la sous-classe IIc. Il s'agit d'une molécule de taille modérée, non modifiée, hydrophobe et chargée positivement. Produite par la souche *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* 9B4, elle est exclusivement active sur les lactocoques¹⁹. Notre motivation essentielle à entreprendre les travaux présentés dans cet article était, d'une part, de produire cette bactériocine en quantités non limitantes et d'autre part, de contribuer à la détermination des relations entre sa structure et sa fonction, par le biais d'une bactériocine tronquée et par la mise en évidence du rôle de la partie N-terminale dans l'activité antibactérienne.

La synthèse peptidique en phase solide est une méthodologie qui offre de nombreuses possibilités pour l'étude des protéines dont la taille ne dépasse pas la soixantaine de résidus et, plus particulièrement ici, l'étude d'une bactériocine et de son analogue délété. Cette technique a été précédemment employée pour la production d'autres bactériocines, notamment la mésentéricine Y 105³⁷, la plantaricine 149²⁶, et la bactériocine J 46²⁵. C'est donc cette technique qui a été utilisée pour produire la lactococcine B.

La synthèse peptidique en phase solide de LnB a été effectuée selon la séquence déterminée par l'équipe de Venema¹⁹. Le rendement final de la synthèse peptidique est de 3 %, comparable à celui des molécules de la même taille déjà synthétisées dans notre laboratoire, ce qui a permis de pallier la faible quantité de bactériocine habituellement produite par la souche productrice, et d'obtenir une quantité suffisante pour entreprendre des travaux ultérieurs.

Nous avons comparé les propriétés physicochimique et biologique de LnB synthétique à celles décrites pour la LnB naturelle par Venemaa et al.²³ et nous les avons trouvées semblables. Les résultats obtenus, suite à cette première synthèse, sont en faveur de l'identité des deux molécules. Par ailleurs, il est intéressant de noter que, après oxydation du peptide synthétique à l'air, aucune activité bactéricide n'a été observée sur les souches indicatrices, ce qui suggère que, une fois oxydée, la bactériocine ne retrouve pas sa forme biologiquement active. Ceci est en accord

avec les observations de Venema et ses collaborateurs³⁸, qui ont montré que LnB perd son activité si le résidu de cystéine en position 24 n'est pas sous sa forme réduite. Il se peut que, par son encombrement stérique, le dimère formé par l'oxydation à l'air de l'unique résidu de cystéine ne puisse plus former de complexe trans-membranaire intervenant dans l'activité de ce type de bactériocine.

Des études de l'effet du remplacement de la Cys 24 de LnB par chacun des 19 autres acides aminés naturels ont montré que ce résidu n'est pas indispensable pour que la molécule soit active³⁸. Toutefois, aucune charge positive en cette position 24 n'est tolérée pour que la LnB puisse conserver son activité. Il a donc été clairement établi que la Cys 24 n'est pas directement impliquée dans l'activité de la lactococcine B³⁸. A cet égard, LnB ressemble aux toxines des bactéries *Streptococcus pneumoniae*, activées par les thiols, dont la forme réduite est indispensable à l'activité de la molécule, bien que la cystéine puisse être remplacée par tous les autres résidus sans qu'il se produise une perte d'activité³⁹.

Ces études ont éveillé notre curiosité sur le mécanisme d'activité de LnB. L'importance éventuelle, dans l'activité biologique de LnB, du résidu de méthionine en position 6, a été évoquée par Venema et al.³⁸ après oxydation de la molécule par l'acide formique. Il nous a semblé que cette hypothèse pouvait être testée par ablation du peptide N-terminal 1-6, une opération facile à obtenir au cours de la synthèse peptidique de la LnB, puisque la synthèse peptidique en phase solide offre la possibilité de prélever un échantillon de peptide-résine à n'importe quel cycle de l'assemblage, et donc de pouvoir obtenir un peptide tronqué du côté N-terminal. Nous avons pratiqué un tel prélèvement, au cours de la synthèse de la LnB, avant le couplage du résidu de Met en position 6. Il en résultait donc un analogue (7-47) de la bactériocine, auquel il manquait les six premiers résidus d'acides aminés du côté N-terminal et, notamment, le résidu de Met à la position 6.

Cet analogue (LnBst) a été purifié et caractérisé selon ses propriétés physico-chimiques, et son activité éventuelle sur la croissance des souches bactériennes indicatrices a été testée, en comparaison avec LnBs. Nous avons alors observé que cet analogue ne montrait aucune activité antibactérienne, et ce à toute concentration et qu'il ait subi ou non une phase d'oxydation à l'air. Cet analogue avait sans

doute perdu son pouvoir actif et son aptitude à induire la mort bactérienne. Il découle de ce résultat une hypothèse séduisante, selon laquelle la partie N-terminale et, particulièrement, les six premiers résidus d'acides aminés, se révéleraient essentiels dans l'activité de la lactococcine B. Etant donné que l'analogue LnBst est tronqué de 6 résidus par rapport à la séquence de LnB, on peut penser qu'il s'agirait d'un ou plusieurs résidus, parmi les six qui se trouvent en position de 1 à 6, qui seraient impliqués dans l'activité biologique de LnB. Les résultats obtenus dans ce travail semblent prometteurs et nous incitent à nous engager, par la suite, dans une étude plus approfondie du mécanisme d'activité de la LnB. Ces études seraient menées essentiellement par mutations ponctuelles des résidus d'acides aminés sélectionnés en fonction de leur position dans la séquence et de leur importance supposée dans l'activité de la molécule.

REMERCIEMENTS

Nos sincères remerciements vont au Docteur L'Houcine OUAFIK pour son aide précieuse. Nous tenons à remercier également Mr le professeur Hervé ROCHAT et Mr le professeur Régis GUIEU pour leur soutien dans ce travail

REFERENCES

- 1- **M.A. Riley et J.E. Wertz** (2002). Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie*, **84**, 357-364.
- 2- **J. Nissen-Meyer, H. Holo, L.S. Havarstein, K. Stellen et I.F. Nes** (1992). A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bacteriol.*, **174**, 5686-5692.
- 3- **T. Aymerich, H. Holo, 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.
- 4- **L.E. Anderssen, D.B. Diep, I.F. Nes, V.G. Eijsink et J. Nissen-Meyer** (1998). Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 2269-2272.
- 5- **I. Tahiri, M. Desbiens, R. Bénéch, E. Kheadr, C. Lacroix, S. Thibault, D. Ouellet et I. Fliss** (2004). Purification, characterization and amino acid sequencing of divergicin M35: a novel class IIa bacteriocin produced by *Carnobacterium divergens* M35. *Int. J. Food. Microbiol.*, **97**, 123-136.
- 6- **N.J. Stern, E.A. Svetoch, B.V. Eruslanov, V.V. Perelygin, E.V. Mitsevich, I.P. Mitsevich, V.D. Pokhilenko, V.P. Levchuk, O.E. Svetoch et B.S. Seal** (2006). Isolation of *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system. *Antimicrobial Agent And Chemotherapy*, **50**, 3111-3116.
- 7- **M. Millette, C. Dupont, D. Archambault et M. Lacroix** (2007). Partial characterization of bacteriocins produced by human *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici* isolates. *J. Appl. Microbiol.*, **102**, 274-282.
- 8- **R.W. Jack, J.R. Tagg et B. Ray** (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.*, **59**, 171-200.
- 9- **T.R. Klaenhammer** (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, **70**, 337-349.
- 10- **W. Soliman, S. Bhattacharjee et K. Kaur** (2007). Molecular dynamics simulation study of interaction between a class IIa bacteriocin and its immunity protein. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1774**, 1002-1013.
- 11- **L.S. Havarstein, D.B. Diep et I.F. Nes** (1995). A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol. Microbiol.*, **16**, 229-240.
- 12- **J.W. Mulders, I.J. Boerringer, H.S. Rollema, R.J. Siezen et W.M. DeVos** (1991). Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *Eur. J. Biochem.*, **201**, 581-584.
- 13- **W. Liu et J.N. Hansen** (1990). Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2551-2558.
- 14- **J.C. Piard, C. Delorme, M. Novel, M. Desmazeaud et G. Novel** (1993). Structure, organization, and expression of the lct gene for lacticin 481, a novel lantibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.*, **268**, 16361-16368.
- 15- **G.N. Moll, W. Konings et A. Driessen** (1999). Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie. Van Leeuwenboek*, **76**, 185-198.

- 16- I.F. Nes, D.B. Diep, L.S. Håvarstein, M.B. Brurberg, V. Eijsink et H. Holo (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenboek*, **70**, 113-128.
- 17- J.T. Henderson, A.L. Chopko et P.D. Van Wassenaar (1992). Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. *Arch. Biochem. Biophys.*, **295**, 2360-2367.
- 18- G.E. Alisson, C. Fremaux et T.R. Klaenhammer (1994). Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the lactacin F operon. *J. Bacteriol.*, **176**, 2235-2241.
- 19- M.J. Van Belkum, J. Kok et G. Venema (1992). Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of lcnB, a third bacteriocin determinant from the lactococcal bacteriocin plasmid p9B4-6. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 572-577.
- 20- R.W. Worobo, M.J. Van Belkum, M. Sailer, K. Roy, J.C. Vederas et M.E. Stiles (1995). A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *J. Bacteriol.*, **177**, 3143-3149.
- 21- M.C. Joerger et Tr. Klaenhammer (1986). Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J. Bacteriol.*, **167**, 439-446.
- 22- Hechard Y, Sahl HG. (2002). Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie*. **84**. 545-557.
- 23- K. Venema, T. Abee, A.J. Haandrikman, K.J. Leenhouts, J. Kok, W.N. Konong et G. Venema (1993). Mode of action of lactococcine B, a thiol-activated bacteriocin from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1041-1048.
- 24- S. Morgan, R.P. Ross et C. Hill (1995). Bacteriolytic activity caused by the presence of a novel lactococcal plasmid encoding lactococcins A, B and M. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 2995-3001.
- 25- S. Lasta, Z. Fajloun, H. Darbon, P. Mansuelle, N. Andreotti, J.M. Sabatier, A. Boudabous et F. Sampieri (2008). Chemical synthesis and characterization of J46 peptide, an atypical class IIa bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* J46 strain. *J. Antibiot.*, **61**, 89-93.
- 26- D.M. Muller, M.S. Carrasco, A.C. Simonette, L.M. Beltramini et G.G. Tonarelli (2007). A synthetic analog of plantaricin 149 inhibiting food-borne pathogenic bacteria-membrane interaction. *Journal of Peptide Science*, **13**, 171-178.
- 27- A. Chopin, M.C. Chopin, A. Moillot-Bat et P. Langella (1984). Two plasmid determined restriction and modification systems in *Streptococcus lactis*. *Plasmid.*, **11**, 260-263.
- 28- R.B. Merrifield (1986). Solid-phase synthesis. *Science*, **232**, 341-347.
- 29- S.S. Wang (1973). p-Alkoxybenzyl alcohol resin and p-alkoxybenzyloxy-carbonylhydrazide resin for solid phase synthesis of protected peptide fragments. *J. Amer. Chem. Soc.*, **95**, 1328-1333.
- 30- P. Sieber (1987). An improved method for anchoring of 9-fluorenylmethyloxycarboxyl-amino acids to 4-alkoxybenzyl alcohol resins. *Tetrahedron Lett.*, **28**, 6147-6150.
- 31- J.R. Tagg et A.R. McGiven (1971). Assay systems for bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.*, **21**, 943-947.
- 32- R. Linding, L.J. Jensen, F. Dielle, P. Bork, T.J. Gibson et L.B. Russel (2003). Protein disorder prediction: implications for structural proteomics. *Structure*, **11**, 1453-1459.
- 33- R. Linding, L.B. Russel, V. Neduva et T.J. Gibson (2003). GlobPlot: exploring protein sequences for globularity and disorder. *Nuc. Acid. Res.*, **3**, 3701-3708.
- 34- B. Rost, G. Yachdav et J. Liu (2004). The predict-Protein server. *Nuc. Acid. Res.*, **32**, W321-W326.
- 35- A.R. Mitchell, B.W. Erickson, M.N. Ryabtsev, R.S. Hodges et R.B. Merrifield (1976). Tert-butoxycarbonylaminoacyl-4-(oxymethyl)-phenylacetamidomethyl-resin, a more acid-resistant support for solid-phase peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 7357-7362.
- 36- S.S. Wang, J.P. Tam, B.S. Wang et R.B. Merrifield (1981). Enhancement of peptide coupling reactions by 4- dimethylaminopyridine. *Int. J. Pept. Protein. Res.*, **18**, 459-467.
- 37- S. Castano, B. Desbat, A. Delfour, J.M. Dumas, A. Da Silvia et J. Dufourcq (2005). Study of structure and orientation of mesentericin Y105, a bacteriocin from Gram-positive *Leuconostoc mesenteroides*, and its Trp-substituted analogues in phospholipids environments. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1668**, 87-98.

- 38- **K. Venema, M.H. Dost, G. Venema et J. Kok** (1996). Mutational analysis and chemical modification of Cys24 of Lactococcin B, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis*. *Microbiology*, **142**, 2825-2830 .
- 39- **G.J. Boulnois, J.C. Paton, T.J. Mitchell et P.W. Andrew** (1991). Structure and function of pneumolysin, the multifunctional, thiol-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.*, **5**, 2611-2616.

