

**MARILAINÉ MOTA-MEIRA**

**ÉTUDE DE LA MUTACINE B-Ny266**

Thèse  
présentée  
à la Faculté des études supérieures  
de l'Université Laval  
pour l'obtention  
du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

Département des sciences des aliments et de nutrition  
FACULTÉ DES SCIENCES DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

Décembre 1999

© Marilaine Mota-Meira, 1999



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file* *Votre référence*

*Our file* *Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-48545-5

**Canada**

À mon époux Marc  
À la mémoire de mes parents (Alcides et Maria)  
« Présents pour l'éternité »

## RÉSUMÉ COURT

L'apparition de souches pathogènes résistantes aux antibiotiques a augmenté et constitue actuellement un problème majeur dans les milieux hospitaliers. Les lantibiotiques sont de bons candidats pour remplacer les antibiotiques auxquels les bactéries sont devenues résistantes. Leur utilisation comme bioconservateurs alimentaires fait également l'objet d'études intensives. À cause de leur spectre d'action étendu, les mutacines des groupes A, B, C, D, I, K, L et M sont de bonnes candidates pour leur développement comme antibiotique. Nous avons sélectionné et caractérisé dans cette étude la mutacine B-Ny266 (groupe B) qui possède le spectre d'action le plus étendu. C'est un peptide de 22 résidus, dont plusieurs sont modifiés, appartenant au groupe des lantibiotiques de type A. Il s'agit de la première mutacine dont la séquence complète a été établie.

L'efficacité de la mutacine B-Ny266 a été comparée à celle de la nisine A, de l'oxacilline et de la vancomycine contre des souches pathogènes (*Listeria* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Neisseria* sp., staphylocoques, streptocoques, entérocoques, peptostreptocoques, *Corynebacterium diphtheriae*, *Propionibacterium acnes*, *Actinomyces viscosus*, *Gardnerella vaginalis*, *Campylobacter jejuni* et *Helicobacter pylori*) et des souches résistantes à la nisine ou aux antibiotiques. La nisine A et la mutacine B-Ny266 sont aussi actives que les deux antibiotiques testés contre la majorité des souches testées. La mutacine B-Ny266 demeure cependant active contre les souches qui sont résistantes à la nisine A, à l'oxacilline ou à la vancomycine. Son spectre d'activité étendu, sa basse CMI contre les souches pathogènes, ainsi que son activité contre les souches résistantes aux autres substances rendent la mutacine B-Ny266 très attrayante pour son développement comme agent thérapeutique.

**ABSTRACT (SHORT)**

The emergence of antibiotic resistant pathogenic strains actually represents a major problem in hospitals. Lantibiotics are good candidates to replace antibiotics to which bacteria became resistant. Their use as food biopreservatives is also under intensive study. Because of their wide activity spectra, mutacins of group A, B, C, D, I, K, L and M are good candidates for their development as antibiotics. We selected and characterized in this study mutacin B-Ny266 (group B) which possesses the widest activity spectra determined for mutacins. It is a 22-residues peptide in which many are modified. It belongs to type A lantibiotics. It is the first mutacin to be completely sequenced.

The efficiency of mutacin B-Ny266 was compared to that of nisin A, oxacillin, and vancomycin against pathogenic strains (*Listeria sp.*, *Bacillus sp.*, *Clostridium sp.*, *Neisseria sp.*, staphylococci, streptococci, enterococci, peptostreptococci, *Corynebacterium diphtheriae*, *Propionibacterium acnes*, *Actinomyces viscosus*, *Gardnerella vaginalis*, *Campylobacter jejuni* et *Helicobacter pylori*) and strains resistant to nisin or antibiotics. Nisin A and mutacin B-Ny266 are as active as the two antibiotics against most of the tested strains. Mutacin B-Ny266 is, however, active against strains resistant to nisin A, oxacillin or vancomycin. Its wide activity spectrum, its low MIC against pathogenic strains, and its activity against strains resistant to the other substances make mutacin B-Ny266 very attractive for its development as a therapeutic agent.

## RÉSUMÉ LONG

L'apparition de souches pathogènes résistantes aux antibiotiques constitue actuellement un problème majeur dans les milieux hospitaliers. Les peptides antimicrobiens, et en particulier les lantibiotiques, sont de bons candidats pour remplacer les antibiotiques auxquels les bactéries sont devenues résistantes. L'intérêt de l'utilisation de telles substances comme bioconservateur alimentaire est également en progression.

Dans le but d'identifier un nouveau peptide antibiotique ayant un spectre d'activité étendu, nous avons criblé des souches de *Streptococcus mutans* productrices de 24 groupes (A à X) de mutacines. L'activité des souches productrices de mutacines ou de lantibiotiques (contrôles) contre plusieurs souches pathogènes a été déterminée par antagonisme différé. Les mutacines A, B, C, D, I, K, L et M, ainsi que les nisines A et Z sont actives contre tous les entérocoques testés. À l'exception des souches productrices des mutacines P, Q et X, toutes les autres souches productrices de bactériocines inhibent les streptocoques testés. Les mutacines A, B, I, J et T, les nisines A et Z, et l'épidermine inhibent les deux souches de *Neisseria gonorrhoeae* résistantes aux antibiotiques testées. Les mutacines A, B, C et D et les nisines A et Z inhibent *Campylobacter jejuni* et *Helicobacter pylori*. Ces résultats confirment le spectre d'activité étendu des nisines A et Z, et ils indiquent que les mutacines des groupes A, B, C, D, I, K, L et M sont de bonnes candidates pour leur développement comme antibiotique. La mutacine B-Ny266 (groupe B) a été sélectionnée pour les études subséquentes.

Dans le but de caractériser et d'établir la structure primaire de cette nouvelle substance, nous avons purifié la mutacine B-Ny266 à partir de culots de cellules de la souche de *Streptococcus mutans* Ny266 par extraction acide en présence d'éthanol, suivie de chromatographies en phase inverse (colonnes de C<sub>18</sub>, Sep-pak® et HPLC). La masse moléculaire de la mutacine B-Ny266 est de 2270 Da, déterminée par électro-vaporisation. La séquence en acides aminés obtenue par la dégradation d'Edman suite au traitement à l'éthanthiol alcalin indique que la mutacine B-Ny266 est composée de 22 résidus et appartient au groupe des lantibiotiques. Elle diffère des épidermines par 5 résidus. Ce peptide cationique contient 4 ponts thioéthers (2 Lan, 1 MeLan et 1 AviCys en C-terminal), 1 résidu dhA et 1

dhB. Il s'agit de la première mutacine dont la séquence complète a été établie. La séquence de la mutacine B-Ny266 est la suivante: F-K-A-W-U-F-A-Abu-P-G-A-A-K-O-G-A-F-N-U-Y-A.

Dans le but de proposer l'usage de la mutacine B-Ny266 comme conservateur alimentaire ou comme agent thérapeutique, l'activité de la mutacine B-Ny266 a été comparée à celle de la nisine A, de l'oxacilline ou de la vancomycine. La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée simultanément pour les quatre substances contre des souches pathogènes et des souches résistantes à la nisine et aux antibiotiques. Les résultats indiquent que la nisine A et la mutacine B-Ny266 sont aussi actives que la vancomycine et l'oxacilline contre la majorité des souches testées (*Listeria* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Neisseria* sp., staphylocoques, streptocoques, entérocoques, peptostreptocoques, *Corynebacterium diphtheriae*, *Propionibacterium acnes*, *Actinomyces viscosus*, *Gardnerella vaginalis*, *Campylobacter jejuni* et *Helicobacter pylori*). Cependant, la mutacine B-Ny266 demeure active contre les souches qui sont résistantes à la nisine A, à l'oxacilline ou la vancomycine. Son spectre d'activité, sa basse CMI contre les souches pathogènes, ainsi que son activité contre les souches résistantes aux autres substances antimicrobiennes rendent la mutacine B-Ny266 très attrayante pour son développement comme agent thérapeutique.

## ABSTRACT (LONG)

The emergence of antibiotic-resistant pathogens strains actually represents a major problem in hospitals. Antimicrobial peptides, and particularly lantibiotics, are good candidates for replacement of antibiotics to which bacteria became resistant. The interest to use such substances as food biopreservatives is also progressing.

In order to identify a new antibiotic peptide with a wide activity spectrum, we screened several *Streptococcus mutans* strains producing 24 groups of mutacins (A – X). The activity of the mutacin or lantibiotic (controls) producing strains was tested against several pathogenic strains by a deferred antagonism test. The mutacins A, B, C, D, I, K, L and M, and nisins A and Z are active against all enterococci tested. With the exception of mutacins P, Q, and X, all other producing strains inhibit the tested streptococci. Mutacins A, B, I, J and T, nisins A and Z, and epidermin inhibit the two antibiotic-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* tested. Mutacins A, B, C and D, and nisins A and Z inhibit *Campylobacter jejuni* et *Helicobacter pylori*. These results confirm the wide activity spectra of nisins A and Z, and indicate that mutacins of groups A, B, C, D, I, K, L, and M are good candidates for their development as antibiotics. Mutacin B-Ny266 (group B) was chosen for the subsequent studies.

In order to characterize and to establish the primary structure of this new substance, we purified mutacin B-Ny266 from cell pellets of *Streptococcus mutans* Ny266 by ethanol acid extraction followed by reversed-phase chromatographies (Sep-pak<sup>®</sup> C<sub>18</sub> and C<sub>18</sub> column on HPLC). Its molecular mass is 2270 Da. The amino acid sequence obtained by Edman degradation following alkaline ethanethiol treatment indicates that mutacin B-Ny266 is composed of 22 residues and belongs to the lantibiotic group. It differs from epidermins by 5 residues. This cationic peptide contains 4 thioether bridges (2 Lan, 1 MeLan and 1 AviCys in C-terminal), 1 dhA residue and 1 dhB. It is the first mutacin for which the complete sequence was established: F-K-Δ-W-U-F-Δ-Δbu-P-G-Δ-A-K-O-G-Δ-F-N-U-Y-A.

In order to propose the use of mutacin B-Ny266 as food preservative or as therapeutic agent, the activity of mutacin B-Ny266 was compared to that of nisin A, oxacillin and



vancomycin. The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was simultaneously determined for these four substances against pathogenic strains and against antibiotic or nisin resistant strains. The results indicate that nisin A and mutacin B-Ny266 are as active as vancomycin and oxacillin against most of the tested strains (*Listeria* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Neisseria* sp., staphylococci, streptococci, enterococci, peptostreptococci, *Corynebacterium diphtheriae*, *Propionibacterium acnes*, *Actinomyces viscosus*, *Gardnerella vaginalis*, *Campylobacter jejuni* et *Helicobacter pylori*). However, mutacin B-Ny266 is active against strains resistant to nisin A, oxacillin or vancomycin. Its activity spectrum, its low MIC against pathogenic strains, and its activity against strains resistant to the other antimicrobial substances, make mutacine B-Ny266 very attractive for its development as therapeutical agent.

## RESUMO LONGO

O surgimento de culturas patogênicas resistentes aos antibióticos aumentou consideravelmente nos últimos anos e estas culturas constituem atualmente um sério problema nos meios hospitalares. Os peptídios antimicrobianos, particularmente os lantibióticos, podem se tornar substitutos aos antibióticos aos quais várias bactérias se tornaram resistentes. O interesse na utilização destes peptídios está em plena progressão sobretudo como conservante alimentar.

Com o objetivo de identificar um novo peptídio antibiótico que possua um espectro de atividade amplo, testamos várias cepas de *Streptococcus mutans* produtoras dos 24 grupos (de A à X) de mutacinas. A atividade das cepas produtoras de mutacinas ou de lantibióticos (utilizados como controles) contra várias cepas patogênicas foi determinada pelo teste de antagonismo diferenciado. As mutacinas A, B, C, D, I, K, L e M assim como as nisinas A e Z são ativas contra todas as cepas de enterococos testadas. Com exceção das cepas produtoras de mutacinas P, Q e X, todas as demais cepas produtoras inibem os estreptococos testados. As mutacinas A, B, I, J e T assim como as nisinas A e Z e a epidermina inibem as duas cepas testadas de *Neisseria gonorrhoeae* resistentes aos antibióticos. As mutacinas A, B, C e D e as nisinas A e Z inibem *Campylobacter jejuni* e *Helicobacter pylori*. Esses resultados confirmam o amplo espectro de atividade das nisinas A e Z e indicam que as mutacinas dos grupos A, B, C, D, I, K, L e M são candidatas privilegiadas para o desenvolvimento dessas substâncias como antibiótico. A mutacina B-Ny266 (grupo B) que possui o mais vasto espectro de atividade entre as mutacinas testadas foi selecionada para os estudos subsequentes.

Para caracterizar e estabelecer a estrutura primária dessa nova substância nós purificamos a mutacina B-Ny266 a partir de células da cultura de *Streptococcus mutans* Ny266 através da extração à etanol ácido seguida pela cromatografia em fase invertida (colunas de C<sub>18</sub>, Sep-pak® et HPLC). A massa molecular dessa substância é de 2270 Da. A sequência em aminoácidos foi obtida pela degradação de Edman após o tratamento da molécula à ethanethiol alcalino. A mutacina B-Ny266 é composta de 22 aminoácidos e ela pertence ao

grupo dos lantibióticos. Ela difere das epiderminas em 5 resíduos. Esse peptídeo catiônico contém 4 pontes thioethers (2 Lan, 1 MeLan et 1 AviCys em C-terminal), 1 resíduo dhA et 1 dhB. Trata-se da primeira mutacina cuja sequência completa foi estabelecida: F-K-A-W-U-F-A-Abu-P-G-A-A-K-O-G-A-F-N-U-Y-A.

Com o objetivo de propor o uso da mutacina B-Ny266 como bioconservante alimentar ou como agente terapêutico, a atividade dessa mutacina foi comparada aquela da nisina A, da oxacilina e da vancomicina. A concentração mínima inibidora (CMI) foi determinada simultaneamente pelas quatro substâncias contra as cepas patogênicas e as cepas resistentes à nisina e aos antibióticos. Os resultados indicam que a nisina A e a mutacina B-Ny266 são tanto ativas quanto à vancomicina e à oxacilina contra a maioria das cepas testadas (*Listeria* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Neisseria* sp., staphylococci, streptococci, enterococci, peptostreptococci, *Corynebacterium diphtheriae*, *Propionibacterium acnes*, *Actinomyces viscosus*, *Gardnerella vaginalis*, *Campylobacter jejuni* et *Helicobacter pylori*). Entretanto, a mutacina B-Ny266 continua ativa contra as cepas que são resistentes à nisina A, à oxacilina ou à vancomicina. Seu espectro de atividade, sua baixa CMI contra as cepas patogênicas e sua atividade contra as cepas resistentes às outras substâncias tornam a mutacina B-Ny266 muito eficaz para o desenvolvimento de agentes terapêuticos.

## REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier le Dr Christophe Lacroix, qui a bien voulu assumer la direction de mes études doctorales et qui a soutenu financièrement cette étude.

Je voudrais remercier également le Dr Gisèle LaPointe, ma co-directrice, pour ces excellentes suggestions.

Je tiens à remercier le Dr Marc Lavoie, directeur du projet, pour ses conseils et ses encouragements ainsi que sa précieuse collaboration pour la réalisation de ce travail.

Mes remerciements également au personnel et à mes collègues de travail du Centre STELA ainsi qu'à ceux du laboratoire du Dr Lavoie, du département ALN et de Biochimie et Microbiologie qui par leur appui technique, leurs conseils et amitié, ont contribué à la réalisation de ce travail. Je pense plus particulièrement à Lise Lemieux, Céline Paquin, Carl Turcotte, Hélène Morency, Diane Marion, Lynda Rodrigue, Harold Marcotte, Jacques Caron, Luc Trudel, Sylvie Bourassa et Lorne Taylor.

Je remercie les organismes subventionnaires qui ont contribué à la réalisation de cette étude: Fonds pour les Chercheurs et de l'Avancement de la Recherche de la Province de Québec (FCAR, Équipe), Société Innovatech Chaudière-Appalache et Conseil de Recherche Médical du Canada (CRM)

J'aimerais remercier particulièrement le « Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brésil) » qui m'a appuyé financièrement (bourse d'études) et qui m'a permis de poursuivre mes études doctorales à l'extérieur de mon pays.

Je suis également reconnaissante envers mes amis qui m'ont supporté par leurs encouragements, plus particulièrement à Breno.

## PRÉAMBULE

La thèse est composée de cinq chapitres. Le chapitre I, intitulé « Introduction générale », a permis d'établir les raisons qui ont conduit à l'élaboration et à la réalisation de ce projet de recherche soit l'importance d'isoler et de caractériser de nouveaux agents antimicrobiens pour les domaines alimentaires et pharmaceutiques. Ce chapitre inclut la problématique, le but et les objectifs du projet ainsi qu'une revue de la littérature sur les substances antimicrobiennes produites par des bactéries. Parmi les métabolites antimicrobiens, les peptides synthétisés par un complexe multi-enzymatique (antibiotiques) et ceux qui sont produits par les ribosomes (bactériocines, lantibiotiques, mutacines) font l'objet de cette revue. Les références bibliographiques de ce chapitre sont présentées à la fin de la thèse.

Le travail rapporté dans le chapitre II, intitulé « Activity of bacterial strains producing mutacins or lantibiotics against pathogenic bacteria », a permis de réaliser l'objectif 1 de mon projet de doctorat: sélectionner une souche de *Streptococcus mutans*, productrice de mutacine à large spectre d'action. Les résultats de ce travail ont été soumis pour publication dans « Antimicrobial Agents and Chemotherapy ». Je suis la deuxième auteure de cette publication. J'ai planifié l'ensemble des expérimentations et j'ai déterminé les antibiogrammes des souches et des isolats multirésistants aux antibiotiques. J'ai participé à l'exécution de l'expérience d'antagonisme différé et j'ai effectué les manipulations des souches pathogènes. J'ai bénéficié de l'aide technique de Mme Diane Marion qui était chargée de la manipulation des souches non pathogènes. La préparation du matériel pour les expérimentations était exécutée par l'étudiante Mme Danielle Tremblay sous ma supervision. L'ensemble des expérimentations a été réalisé par moi et par Mme Marion. L'étape d'inoculation des souches productrices de bactériocines ou de lantibiotiques sur gélose a été faite par Mme Marion et par Mme Tremblay. La deuxième étape de l'expérience, soit l'application des souches indicatrices sur les plaques de Pétris contenant les antimicrobiens a été réalisée par moi et par Mme Marion. Toutefois, lorsqu'il s'agissait de souches pathogènes, cette étape a été réalisée uniquement par moi. La lecture et le traitement des résultats ont été effectués par Mme Hélène Morency, assistante de recherche. H. Morency a procédé au regroupement par similarité des substances

inhibitrices. J'ai participé également à l'interprétation des résultats et à la rédaction de l'article. Dr M. Lavoie a assuré la supervision des travaux, la rédaction de l'article ainsi que la correction en collaboration avec le Dr C. Lacroix et la Dr G. LaPointe.

Le travail rapporté au chapitre III, intitulé « Purification and structure of mutacin B-Ny266: a new lantibiotic produced by *Streptococcus mutans* » a permis de réaliser le deuxième l'objectif de mon projet de doctorat: caractériser et établir la structure primaire de la mutacine B-Ny266. Les résultats de ce travail ont été publiés dans le journal « FEBS Letters ». Elle a également conduit au dépôt d'un brevet (canadien No 2,209,893 et américain dossier No 12406.3). Je suis l'auteure principale de cette publication. J'ai effectué l'ensemble des expérimentations. J'ai participé à l'interprétation des résultats et à la rédaction de l'article. Dr M. Lavoie a assuré la supervision des travaux et il a participé à la rédaction ainsi qu'à la révision de l'article en collaboration avec le Dr C. Lacroix et la Dr G. LaPointe.

Le travail rapporté au chapitre IV, intitulé « Minimum inhibitory concentrations of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens », a permis de réaliser l'objectif 3 de mon projet de doctorat: comparer l'efficacité de la mutacine B-Ny266 par rapport à la nisine (lantibiotique utilisé comme bioconservateur alimentaire) et à deux antibiotiques de dernier recours (oxacilline et vancomycine) contre des souches bactériennes pathogènes d'importance clinique et alimentaire. Ce manuscrit a été soumis au journal « Antimicrobial Agents and Chemotherapy ». Je suis l'auteure principale de cette publication. J'ai effectué l'ensemble des expérimentations. J'ai coordonné l'interprétation des résultats et la rédaction de l'article. Dr M. Lavoie a assuré la supervision des travaux et il a participé à la rédaction ainsi que la correction de l'article en collaboration avec le Dr C. Lacroix et la Dr G. LaPointe.

Le chapitre V, intitulé « Discussion et conclusions », est composé d'une discussion générale suivie des conclusions pour chacune de trois parties de la thèse (Chap. II, III et IV). Des suggestions d'études futures sont aussi présentées dans ce chapitre.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ COURT .....</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT (SHORT) .....</b>	<b>IV</b>
<b>RÉSUMÉ LONG.....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT (LONG).....</b>	<b>VII</b>
<b>RESUMO LONGO .....</b>	<b>IX</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>XI</b>
<b>PRÉAMBULE.....</b>	<b>XII</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>XIV</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>XIX</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>XXII</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>XXIII</b>

### CHAPITRE I

<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE.....</b>	<b>1</b>
<b>PROBLÉMATIQUE GÉNÉRALE .....</b>	<b>2</b>
<b>DOMAINE ALIMENTAIRE .....</b>	<b>2</b>
<b>DOMAINE PHARMACEUTIQUE.....</b>	<b>3</b>
<b>BUT ET OBJECTIFS DU PROJET .....</b>	<b>4</b>
<b>REVUE DE LA LITTÉRATURE .....</b>	<b>6</b>

<b>1.1. SUBSTANCES ANTIMICROBIENNES PRODUITES PAR DES BACTÉRIES .....</b>	<b>6</b>
<b>1.2. LES PEPTIDES ANTIMICROBIENS.....</b>	<b>7</b>
<b>1.2.1. MODE D'ACTION DES PEPTIDES CATIONIQUES .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2.2. PEPTIDES ANTIBIOTIQUES SYNTHÉTISÉS PAR UN COMPLEXE ENZYMATIQUE .....</b>	<b>8</b>
<b>1.2.3. PEPTIDES ANTIBIOTIQUES SYNTHÉTISÉS PAR LES RIBOSOMES.....</b>	<b>8</b>
<b>1.3. LES BACTÉRIOCINES .....</b>	<b>10</b>
<b>1.3.1. HISTORIQUE.....</b>	<b>10</b>
<b>1.3.2. BACTÉRIOCINES DES BACTÉRIES À GRAM POSITIF .....</b>	<b>12</b>
<b>1.3.3. NOMENCLATURE .....</b>	<b>14</b>
<b>1.3.4. CLASSIFICATION .....</b>	<b>14</b>
<b>1.3.5. BACTÉRIOCINES <i>VERSUS</i> ANTIBIOTIQUES .....</b>	<b>15</b>
<b>1.4. LES LANTIBIOTIQUES.....</b>	<b>18</b>
<b>1.4.1. HISTORIQUE.....</b>	<b>18</b>
<b>1.4.2. CARACTÉRISTIQUES .....</b>	<b>19</b>
<b>1.4.3. CLASSIFICATION .....</b>	<b>22</b>
1.4.3.1. Lantibiotiques de type A.....	26
1.4.3.1.1. Classe AI.....	27
1.4.3.1.2. Classe AII.....	28
1.4.3.2. Lantibiotiques de type B .....	29
<b>1.4.4. ASPECTS STRUCTURAUX.....</b>	<b>30</b>
1.4.4.1. Acides aminés non-usuels.....	30
1.4.4.2. Structure primaire des lantibiotiques .....	32
1.4.4.3. Synthèse des acides aminés non-usuels.....	37
1.4.4.4. Rôle des acides aminés non-usuels.....	42
<b>1.4.5. BIOSYNTHÈSE DES LANTIBIOTIQUES .....</b>	<b>43</b>
1.4.5.1. Modification .....	43
1.4.5.2. Clivage et sécrétion.....	44
1.4.5.3. Régulation de la biosynthèse.....	47
1.4.5.4. Immunité des souches productrices .....	47
1.4.5.5. Déterminants génétiques .....	48
<b>1.4.6. ACTIVITÉ BIOLOGIQUE.....</b>	<b>52</b>
1.4.6.1. Activité biologique de lantibiotiques de type A.....	52
1.4.6.2. Activité biologique de lantibiotiques de type B .....	55
<b>1.4.7. RÉSISTANCE AUX BACTÉRIOCINES .....</b>	<b>56</b>
1.4.7.1. Résistance naturelle aux bactériocines des bactéries à Gram négatif.....	56
1.4.7.2. Résistance aux bactériocines des bactéries à Gram positif .....	57
1.4.7.3. Résistance croisée.....	61
<b>1.4.8. APPLICATIONS.....</b>	<b>62</b>
1.4.8.1. Applications alimentaires.....	64
1.4.8.2. Applications pharmaceutiques .....	66



<b>1.5. LES MUTACINES.....</b>	<b>68</b>
<b>1.5.1. HISTORIQUE ET DÉFINITION .....</b>	<b>68</b>
<b>1.5.2. CLASSIFICATION .....</b>	<b>68</b>
<b>1.5.3. CARACTÉRISTIQUES .....</b>	<b>69</b>

## **CHAPITRE II**

<b>ACTIVITY OF BACTERIAL STRAINS PRODUCING MUTACINS OR LANTIBIOTICS AGAINST PATHOGENIC BACTERIA .....</b>	<b>80</b>
<b>2.1. RÉSUMÉ .....</b>	<b>81</b>
<b>2.2. ABSTRACT.....</b>	<b>82</b>
<b>2.3. INTRODUCTION.....</b>	<b>83</b>
<b>2.4. MATERIALS AND METHODS .....</b>	<b>84</b>
<b>2.4.1. BACTERIAL STRAINS.....</b>	<b>84</b>
<b>2.4.2. DETERMINATION OF ACTIVITY SPECTRA .....</b>	<b>84</b>
<b>2.5. RESULTS .....</b>	<b>85</b>
<b>2.6. DISCUSSION .....</b>	<b>86</b>
<b>2.7. ACKNOWLEDGMENTS.....</b>	<b>89</b>
<b>2.8. REFERENCES.....</b>	<b>90</b>

## **CHAPITRE III**

<b>PURIFICATION AND STRUCTURE OF MUTACIN B-NY266: A NEW LANTIBIOTIC PRODUCED BY <i>STREPTOCOCCUS MUTANS</i>.....</b>	<b>110</b>
<b>3.1. RÉSUMÉ .....</b>	<b>111</b>
<b>3.2. ABSTRACT.....</b>	<b>112</b>
<b>3.3. INTRODUCTION.....</b>	<b>114</b>

<b>3.4. MATERIAL AND METHODS.....</b>	<b>115</b>
<b>3.4.1. MUTACIN PRODUCTION .....</b>	<b>115</b>
<b>3.4.2. DETERMINATION OF INHIBITORY ACTIVITY .....</b>	<b>115</b>
<b>3.4.3. MUTACIN EXTRACTION AND PURIFICATION .....</b>	<b>115</b>
<b>3.4.4. POLARITY CALCULATION .....</b>	<b>116</b>
<b>3.4.5. PURITY ASSESSMENT .....</b>	<b>116</b>
<b>3.4.6. MOLECULAR MASS DETERMINATION .....</b>	<b>116</b>
<b>3.4.7. AMINO ACID ANALYSIS .....</b>	<b>117</b>
<b>3.4.8. SEQUENCE DETERMINATION.....</b>	<b>117</b>
<b>3.4.9. PROTEIN SEQUENCE ACCESSION NUMBER .....</b>	<b>117</b>
<b>3.5. RESULTS .....</b>	<b>118</b>
<b>3.6. DISCUSSION .....</b>	<b>119</b>
<b>3.7. ACKNOWLEDGMENTS.....</b>	<b>122</b>
<b>3.8. REFERENCES.....</b>	<b>123</b>

## **CHAPITRE IV**

<b>MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATIONS OF MUTACIN B-NY266, NISIN A, VANCOMYCIN, AND OXACILLIN AGAINST BACTERIAL PATHOGENS.....</b>	<b>130</b>
<b>4.1. RÉSUMÉ .....</b>	<b>131</b>
<b>4.2. ABSTRACT.....</b>	<b>132</b>
<b>4.3. INTRODUCTION.....</b>	<b>133</b>
<b>4.4. MATERIALS AND METHODS .....</b>	<b>134</b>
<b>4.4.1. BACTERIAL STRAINS, AND CULTURE CONDITIONS.....</b>	<b>134</b>
<b>4.4.2. ANTIMICROBIAL AGENTS.....</b>	<b>134</b>
<b>4.4.3. DETERMINATION OF THE MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATIONS .....</b>	<b>135</b>
<b>4.4.4. HEMOLYTIC ACTIVITY .....</b>	<b>135</b>
<b>4.4.5. ANTIBIOGRAMS .....</b>	<b>136</b>
<b>4.5. RESULTS .....</b>	<b>136</b>
<b>4.6. DISCUSSION .....</b>	<b>139</b>

<b>4.7. ACKNOWLEDGMENTS.....</b>	<b>145</b>
<b>4.8. REFERENCES.....</b>	<b>146</b>

## **CHAPITRE V**

<b>DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....</b>	<b>173</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>183</b>

## LISTE DES TABLEAUX

### Chapitre I

Tableau 1.1. Liste et caractéristiques des lantibiotiques rapportés dans la littérature. ....	20
Tableau 1.2. Gènes impliqués dans la biosynthèse, la régulation et l'immunité des lantibiotiques.....	50
Tableau 1.3. Applications et quelques exemples de brevets revendiqués pour les lantibiotiques.....	63
Tableau 1.4. Avancement des phases de développement pour l'utilisation de la nisine comme agent thérapeutique. ....	66
Tableau 1.5. Principales caractéristiques des mutacines.....	70

### Chapitre II

Tableau 2.1. Inhibitory strains used in this study. ....	96
Tableau 2.2. Bacterial pathogens tested for their sensitivity towards mutacins and lantibiotics.....	98
Tableau 2.3. Activity <sup>a</sup> of bacterial strains producing a mutacin or a lantibiotic against micrococci, peptostreptococci and enterococci.....	101
Tableau 2.4. Activity <sup>a</sup> of bacterial strains producing a mutacin or a lantibiotic against staphylococci.....	102
Tableau 2.5. Activity <sup>a</sup> of bacterial strains producing a mutacin or a lantibiotic against streptococci. ....	103
Tableau 2.6. Activity <sup>a</sup> of bacterial strains producing a mutacin or a lantibiotic against Gram-positive rods. ....	105
Tableau 2.7. Activity <sup>a</sup> of bacterial strains producing a mutacin or a lantibiotic against Gram-negative pathogens. ....	107
Tableau 2.8. Activity <sup>a</sup> of bacterial strains producing a mutacin or a lantibiotic against nisin resistant mutants. ....	108

### Chapitre III

Tableau 3.1. Mean yield of mutacin B-Ny266 for each purification step <sup>a</sup> .....	126
Tableau 3.2. Amino acid composition of mutacin B-Ny266. ....	127
Tableau 3.3. Comparison of the first 7 N-terminal amino acids of mutacin B-Ny266 with other known lantibiotics of group A.....	128

### Chapitre IV

Tableau 4.1. Bacterial strains and test conditions.....	153
Tableau 4.2. Antibiotic resistance patterns of clinical and mouse isolates as determined by antibiogram. ....	159
Tableau 4.3. Activity of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin and oxacillin against four <i>Micrococcus luteus</i> strains. ....	161
Tableau 4.4. Activity of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin and oxacillin against enterococci. ....	162
Tableau 4.5. Activity of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin and oxacillin against <i>Listeria</i> spp.....	163
Tableau 4.6. Activity of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin and oxacillin against staphylococci.....	164
Tableau 4.7. Activity of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin and oxacillin against streptococci. ....	166
Tableau 4.8. Activity of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin and oxacillin against spore-forming Gram-positive bacilli. ....	167
Tableau 4.9. Activity of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin and oxacillin against miscellaneous Gram-positive pathogens. ....	168
Tableau 4.10. Activity of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin and oxacillin against Gram-negative pathogens. ....	169
Tableau 4.11. Activity of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin and oxacillin against <i>Neisseria</i> strains. ....	170
Tableau 4.12. Activity of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin and oxacillin against other lantibiotic-producing strains.....	171

<b>Tableau 4.13. Activity of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin and oxacillin against nisin-resistant mutants. ....</b>	<b>172</b>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

## LISTE DES FIGURES

### Chapitre I

Figure 1.1. Schéma de la classification des lantibiotiques selon leur structure et leur séquence signal.....	23
Figure 1.2. Comparaison des différents types de peptides signal chez les lantibiotiques et les bactériocines.....	25
Figure 1.3. Principaux acides aminés non-usuels et résidus dérivés des acides aminés retrouvés dans les lantibiotiques.....	31
Figure 1.4. Longueur du peptide signal et du pré-peptide; séquence des pro-peptides et des peptides mature (avec les modifications après traduction) pour différents lantibiotiques de types A et B.....	35
Figure 1.5. Structures représentatives des principaux lantibiotiques.....	36
Figure 1.6. Mécanisme de formation des lanthionines durant la maturation des lantibiotiques.....	38
Figure 1.7. Mécanisme de formation de l'aminovinyl-D-cystéine (AviCys).....	40
Figure 1.8. Schéma de la biosynthèse de l'épidermine: modifications du pré-peptide (LanA).46	46
Figure 1.9. Modèles proposés pour la formation des pores dans les membranes cytoplasmiques par les lantibiotiques cationiques de type A, lorsqu'ils sont en solution.....	54

### Chapitre II

Figure 2.1. Grouping of the lantibiotic- or mutacin-producing strains according to the similarity of their activity spectra against the tested pathogen strains bacterial ..	109
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

### Chapitre III

Figure 3.1. Comparison of the proposed structure of mutacin B-Ny266 with those of epidermin (staphylococcin 1580) and gallidermin.....	129
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

## LISTE DES ABRÉVIATIONS [Acides aminés (code à une lettre)]

### [Polaire, chargé (+1), pH 6,0]

Arginine	Arg	(R)
Lysine	Lys	(K)
Histidine	His	(H)

### [Polaire, chargé (-1), pH 6,0]

Acide aspartique	Asp	(D)
Acide glutamique	Glu	(E)

### [Polaire, non-chargé]

Tryptophane	Trp	(W)
Tyrosine	Tyr	(Y)
Sérine	Ser	(S)
Thréonine	Thr	(T)
Cystéine	Cys	(C)
Asparagine	Asn	(N)
Glutamine	Gln	(Q)

### [Hydrophobe, non-chargé]

Valine	Val	(V)
Isoleucine	Ile	(I)
Leucine	Leu	(L)
Méthionine	Met	(M)
Phénylalanine	Phe	(F)
Glycine	Gly	(G)
Alanine	Ala	(A)
Proline	Pro	(P)

### [Non-usuels]

Lanthionine	Lan
β-Méthyllanthionine	MeLan ou BM-Lan
2,3-Didéhydroalanine	dhA (U)
2,3-Didéhydrobutyrine	dhB (O)
Acide <i>erythro</i> -3-hydroxy-L-aspartique	HyAsp
S-(Z)-2-aminovinyl-D-cystéine	AviCys
S-Aminovinyl-D-méthyl-cystéine	AviMeCys
(2S, 8S)-Lysinoalanine	LysN-Ala
D-Alanine	D-Ala
2-Oxopropionyle	Op
2-Hydroxy-propionyle	Hp
2-Oxobutyryle	Ob
<i>Allo</i> isoleucine	<i>a</i> Ile
Diméthyl-N-Alanine	Me2N-Ala
Acide 2-aminobutyrique	Abu



## **CHAPITRE I**

### **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

## **PROBLÉMATIQUE GÉNÉRALE**

### **DOMAINE ALIMENTAIRE**

Un des principaux problèmes de conservation des aliments à l'état frais ou légèrement transformés est la présence de microorganismes. Ces microorganismes peuvent attaquer les constituants alimentaires et rendre les aliments impropres à la consommation. De plus, certains peuvent provoquer des infections et des intoxications alimentaires. La réfrigération seule n'assure qu'une courte durée de vie de tablette aux aliments. Avec le développement de nouvelles générations d'aliments réfrigérés, soit avec ou sans traitement thermique minimal, emballés sous vide ou sous atmosphères modifiées, le risque de contamination par les bactéries psychrotrophes et par les bactéries pathogènes (*Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, etc.) a augmenté. Ceci justifie la nécessité de développer des méthodes alternatives de conservation des aliments, qui viennent s'ajouter à la réfrigération.

Depuis quelques années, on remarque un accroissement de l'intérêt pour l'utilisation de métabolites microbiens actifs contre les bactéries pathogènes et celles qui détériorent les aliments. Parmi ces métabolites, les bactériocines (peptides antimicrobiens synthétisés par les ribosomes possédant une partie biologiquement active de nature protéique et un mode d'action bactéricide), principalement celles qui sont produites par les bactéries lactiques, dont la nisine, font l'objet de nombreuses études. La nisine est produite par des souches de *Lactococcus lactis* et est le seul lantibiotique actuellement utilisé comme bioconservateur alimentaire. Le succès de la nisine a stimulé l'intérêt pour la recherche de nouvelles bactériocines (lantibiotiques ou non).

## DOMAINE PHARMACEUTIQUE

Les cinquante dernières années ont été considérées comme « l'ère des antibiotiques classiques » où des produits bactéricides naturels et semi-synthétiques ont été utilisés avec beaucoup de succès dans les traitements d'infections diverses. Cependant, même les meilleurs antibiotiques démontrent une diminution d'efficacité. La résistance aux antibiotiques se fait de plus en plus fréquente chez les bactéries. La croissance rapide et la plasticité génétique des bactéries engendre des mutants conduisant à l'adaptation aux nouveaux environnements. La mutation confère aux bactéries une résistance afin qu'elles survivent aux attaques des antibiotiques utilisés dans différentes thérapies. Deux facteurs ont accéléré le développement de la résistance: l'accumulation de mutations chez les bactéries pathogènes où des classes entières d'antibiotiques sont devenues inactives, et l'absence de nouvelles classes d'antibiotiques depuis 30 ans (Hancock, 1997).

Actuellement, il y a un intérêt croissant pour les peptides antibiotiques, spécialement les peptides cationiques. Des centaines de molécules ont été synthétisées et seulement quelques-unes ont été retenues pour usage clinique. A cause du potentiel qui est offert par les peptides antibiotiques pour le traitement des maladies ou d'infections produites par les bactéries à Gram positif, leur utilisation est de plus en plus envisagée. Étant donné que les bactéries sont tuées rapidement par une perturbation physique des membranes cellulaires, les peptides antibiotiques ne devraient pas faire face à l'apparition rapide de résistance (Hancock, 1997). Cependant, des mutants résistant aux bactériocines (ex. nisine) ont été sélectionnés en laboratoire (voir section 1.4.7, résistance aux bactériocines).

## BUT ET OBJECTIFS DU PROJET

Le but principal de notre travail est l'étude d'une nouvelle substance antibactérienne (mutacine B-Ny266) qui pourrait éventuellement être utilisée soit comme bioconservateur alimentaire ou comme agent thérapeutique contre les souches bactériennes pathogènes et plus particulièrement contre celles qui sont résistantes aux antibiotiques. Pour y parvenir, les objectifs spécifiques à atteindre et la méthodologie utilisée étaient:

**(1) Sélectionner une souche de *Streptococcus mutans* productrice d'une bactériocine à large spectre d'action (Chapitre II)**

Sélectionner une souche bactérienne productrice de bactériocine parmi les souches de *Streptococcus mutans* du laboratoire du Dr Lavoie. Le critère principal de ce choix est le spectre d'inhibition qui doit être très étendu. Il faut que la substance produite soit capable d'inhiber les souches indésirables dans le domaine alimentaire ainsi que les souches pathogènes d'importance clinique. La méthode d'antagonisme différé a été utilisée pour déterminer l'activité de 24 souches mutacinogènes (A à X) contre une gamme de souches cibles. Ce spectre a ensuite été comparé avec celui des souches productrices de nisines A et Z, subtiline, épidermine, gallidermine et mutacines b et B-JH1140.

**(2) Purifier, séquencer et caractériser la mutacine B-Ny266****(Chapitre III)**

La mutacine a été extraite à partir de culots bactériens de *S. mutans* Ny266 par l'éthanol à pH acide. Le peptide a été purifié selon l'hydrophobicité par chromatographie à phase inverse. Les analyses biochimiques pour caractériser le peptide ont été réalisées avec la substance pure. La masse moléculaire a été déterminée par électro-vaporisation, la composition en acides aminés par l'hydrolyse acide et la dérivation à l'*o*-phthaldialdéhyde (OPA) et la séquence en acides aminés par la dégradation d'Edman suite à la dérivation du peptide par l'éthanthiol alcalin.

**(3) Déterminer l'efficacité de la mutacine B-Ny266 contre des souches pathogènes****(Chapitre IV)**

L'efficacité de la mutacine B-Ny266 a été évaluée par rapport à la nisine (lantibiotique utilisé comme conservateur alimentaire) et à deux antibiotiques de dernier recours (oxacilline et vancomycine). La technique de la concentration minimale inhibitrice (MIC) a été utilisée pour évaluer la concentration minimale bactéricide contre des souches bactériennes pathogènes importantes dans les domaines alimentaire et clinique ainsi que contre des souches multi-résistantes aux antibiotiques.

## **REVUE DE LA LITTÉRATURE**

### **1.1. SUBSTANCES ANTIMICROBIENNES PRODUITES PAR DES BACTÉRIES**

Plusieurs substances chimiques sont libérées à l'extérieur des cellules bactériennes durant les différentes étapes de leur croissance. Certaines de ces substances ont comme fonction l'inhibition de la croissance d'autres bactéries (amensalisme ou antagonisme) concurrentes dans une niche écologique donnée (Tagg, 1992). Parmi ces métabolites, nous retrouvons:

- (a) des métabolites primaires de faible masse moléculaire comme les acides organiques (lactique, acétique, propionique) et leurs sels, les alcools (éthanol), les cétones (diacétyl), les aldéhydes (acétaldéhyde), et d'autres petites molécules comme l'ammonium et le peroxyde d'hydrogène;
- (b) des peptides antimicrobiens synthétisés par voies multi-enzymatiques, les « antibiotiques classiques » (bacitracine, valinomycine, gramicidine, polymyxine B);
- (c) des peptides antibiotiques synthétisés par les ribosomes comme précurseur peptidique qui peuvent (lantibiotiques, microcines, cécropines) ou non (bactériocines non-modifiées) subir des modifications enzymatiques après la traduction du précurseur;
- (d) des protéines antibiotiques de masse moléculaire comprise entre 50-100 kDa, les « bactériocines classiques » (colicines);
- (e) des enzymes bactériolytiques (ex. lysozymes, phospholipase A et hémolysines);
- (f) des toxines (ex. choléra, diphtérie et tétanos);
- (g) des bactériophages défectueux (quelques pyocines).

## **1.2. LES PEPTIDES ANTIMICROBIENS**

Les peptides antibiotiques peuvent être divisés en deux sous-groupes; les peptides produits par un complexe multi-enzymatique (les antibiotiques classiques) et ceux synthétisés par les ribosomes comme précurseur peptidique et qui subissent (les lantibiotiques) ou non des modifications enzymatiques après traduction. La principale différence entre ces deux groupes est que ceux synthétisés par les ribosomes sont codés par un gène spécifique (structural), et ceux synthétisés par un complexe multi-enzymatique ne le sont pas (Jack et Jung, 1998). Dans ce dernier cas, plusieurs gènes codent pour les enzymes nécessaires à la biosynthèse des antibiotiques.

### **1.2.1. MODE D'ACTION DES PEPTIDES CATIONIQUES**

L'effet bactéricide de ces peptides découle de la formation de canaux à travers la membrane cytoplasmique. Les résidus chargés positivement interagissent avec les charges négatives de la membrane. Sous l'influence du potentiel électrique des membranes cytoplasmiques, les peptides passent d'une forme non-structurée à une forme structurée. Ils forment des agrégats et leur côté hydrophobe est dirigé vers l'intérieur de la membrane pour former des canaux. L'intégrité de la membrane est détruite et la cellule bactérienne meurt.

La formation de pores dans la membrane est favorisée par un potentiel membranaire élevé, par la quantité élevée de lipides chargés négativement et, par l'absence de lipides cationiques et de cholestérol dans la membrane cytoplasmique (caractéristiques des membranes bactériennes). Les cellules eucaryotes possèdent un potentiel membranaire et un niveau de cholestérol élevé et très peu de lipides anioniques, ce qui explique la sélectivité des peptides cationiques envers les bactéries (Hancock, 1997).

### **1.2.2. PEPTIDES ANTIBIOTIQUES SYNTHÉTISÉS PAR UN COMPLEXE ENZYMATIQUE**

Le mécanisme de formation des peptides antibiotiques qui ne sont pas synthétisés par les ribosomes a été bien étudié. Le nombre d'enzymes impliquées est exceptionnellement élevé. Chacune contient plusieurs domaines différents capables d'exécuter une ou plusieurs étapes de la biosynthèse des peptides. Après chaque étape, le peptide passe au domaine suivant pour les futures étapes de la synthèse (Jack et Jung, 1998).

Les peptides antimicrobiens formés par un complexe enzymatique peuvent être produits par des mycètes comme c'est le cas de l'alaméthicine (produite par le *Trichoderma viride*) ou encore par des bactéries (Jack et Jung, 1998). La gramicidine S, peptide cyclique produit par des souches de *Bacillus*, est utilisée en application topique dans le traitement des infections. La bacitracine (produite par *Bacillus licheniformis*) est un peptide cyclique qui ne forme pas de canaux à ions mais qui inhibe la biosynthèse de la paroi cellulaire. Elle est utilisée comme antiseptique pour des applications locales. La valinomycine est un peptide ionophore cyclique très hydrophobe, qui forme des canaux à ions dans la membrane cytoplasmique. La polymyxine-B, produite par *Bacillus polymyxa*, est un peptide qui possède une extrémité aminée libre et une région carboxyle cyclique. Elle est active contre certaines bactéries à Gram négatif en perturbant la membrane externe. Elle est utilisée dans le traitement des infections intestinales (Jack et Jung, 1998).

### **1.2.3. PEPTIDES ANTIBIOTIQUES SYNTHÉTISÉS PAR LES RIBOSOMES**

Les peptides antimicrobiens synthétisés par les ribosomes sont très répandus dans la nature. Ils peuvent être produits par des procaryotes (bactéries) ainsi que par des eucaryotes (mycètes, plantes, animaux vertébrés et invertébrés: mammifères, insectes, amphibiens). Ces peptides sont des composantes importantes des défenses naturelles de plusieurs organismes contre les infections microbiennes, principalement bactériennes (Jack et Jung, 1998). Ils forment un groupe de peptides qui sont, selon leur structure primaire, généralement cationiques, amphiphiles, et plusieurs parmi eux tuent les bactéries par la formation de pores dans la membrane des cellules cibles. Leur charge positive facilite les interactions avec les



membranes phospholipidiques (chargées négativement) et la paroi cellulaire des bactéries (qui a un caractère acide), tandis que leur caractère amphiphile permet la perméabilisation membranaire (Nissen-Meyer et Nes, 1997).

Les peptides antimicrobiens, chez les animaux, forment la première ligne de défense car ils sont synthétisés et diffusent plus rapidement que les protéines et les cellules immunitaires (ex. ils se forment 100 fois plus vite que les IgM) (Nissen-Meyer et Nes, 1997). Chez les mammifères, les peptides antimicrobiens (ex. défensines) constituent la majorité des substances protéiniques des neutrophiles. Les défensines sont retrouvées dans les cellules de la muqueuse épithéliale et les phagocytes, incluant la langue, la trachée et l'intestin (Hancock, 1997). Ces peptides ont un spectre d'action étendu, même en concentrations micromolaires, contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, les mycètes et quelques virus enveloppés (Nissen-Meyer et Nes, 1997). Ce sont des molécules riches en arginine et lysine et qui contiennent des liens disulfures (formés par deux cystéines) dans leur structure.

Chez les insectes, les infections bactériennes provoquent la libération des peptides antimicrobiens (ex. cécropines). Chez les amphibiens (la grenouille), la peau contient des glandes qui produisent des peptides de défense (magainines) contre les microorganismes de l'eau.

## 1.3. LES BACTÉRIOCINES

### 1.3.1. HISTORIQUE

Le phénomène d'inhibition d'une souche bactérienne par une autre est connu depuis longtemps. Pasteur et Joubert en 1877 ont observé l'effet inhibiteur des bactéries présentes dans l'urine (milieu de culture) contre le *Bacillus anthracis* (cité par Tagg *et al.* 1976). Cependant, la première étude systématique a été effectuée par Gratia en 1925. Celui-ci montra qu'une souche d'*E. coli* V produisait une substance bactéricide (même lorsque très diluée) envers une autre souche d'*E. coli*  $\phi$ . Il donna le nom à cette substance de « principe V » (aujourd'hui elle est connue sous le nom de colicine V; Reeves, 1965). Toutefois, c'est en 1946 que le terme colicine fut introduit par Gratia et Frédéricq (cité par Frédéricq, 1948).

Des substances analogues ont ensuite été décrites chez plusieurs membres de la famille des *Enterobacteriaceae*, une classification de ces substances en 17 types différents selon leur spectre d'activité sur une série de mutants résistants aux colicines a été établie (Frédéricq, 1948). Cependant, d'autres colicines ont été découvertes ainsi Hamon et Péron (1963) se réfèrent à 23 types (Reeves, 1965). La plupart des colicines sont des protéines de masse moléculaire élevée qui varie entre 25 et 80 kDa. Par contre, la colicine V, une substance thermostable de faible masse moléculaire (6 kDa), ferait plutôt partie des microcines. Les microcines forment un groupe des bactériocines de faible masse moléculaire (< 10 kDa) produites par des membres de la famille des *Enterobacteriaceae* (Kolter et Moreno, 1992). Les microcines sont souvent modifiées après la traduction du peptide (microcine B17) et peuvent être divisées, selon leur mode d'action, en trois groupes: groupe A qui inhibe les enzymes métaboliques, groupe B qui inhibe la réplication de l'ADN (microcine B17) et groupe C qui interfère avec la production d'énergie (Nissen-Meyer et Nes, 1997). Toutefois, la production de substances similaires par d'autres espèces bactériennes a aussi été observée. Le terme bactériocine a été utilisé alors pour désigner ces substances inhibitrices produites par différentes espèces bactériennes (à Gram négatif ou à Gram positif; Jacob *et al.* 1953).

Les premières observations d'antagonisme produit par des souches bactériennes à Gram positif datent de 1928, lorsque Rogers et Whittier ont publié que les métabolites de *Streptococcus lactis* (aujourd'hui elle est connue sous le nom de *Lactococcus lactis*) inhibaient d'autres bactéries lactiques. En 1933, Whitehead a observé que certaines souches de streptocoques étaient capables d'inhiber la croissance et la production d'acide par des cultures lactiques lors des premières étapes de fermentation du lait pour la production de fromage. En 1947, Mattick et Hirsch ont constaté que ces métabolites de nature polypeptidique étaient produits par des souches de streptocoques du groupe N (classification de Lancefield) et ils ont donné le nom « nisin » pour désigner « N Inhibitory Substance ». C'est en 1951, cependant, que Hirsch *et al.* ont suggéré l'utilisation de la nisine comme conservateur alimentaire. La nisine a été utilisée avec succès pour prévenir la détérioration de fromage type Suisse par l'inhibition de la croissance de bactéries anaérobies sporulantes. En 1969, la nisine a été réglementée par la FAO/WHO pour l'usage alimentaire (dose < 33000 UI/Kg/J) (Molitor et Sahl, 1991). Dix ans plus tard, son utilisation a été permise dans 27 pays à travers le monde, mais c'est en 1988 que le FDA (Food and Drug Administration, USA) lui donne le statut de « GRAS » (Generally Recognized As Safe) (Molitor et Sahl, 1991). En 1971, Gross et Morell ont publié la structure de la nisine A: polypeptide de 34 acides aminés dont certains sont modifiés. Aujourd'hui, la nisine est la seule bactériocine utilisée, à l'état pure, comme conservateur alimentaire (voir section 1.4.8, applications), les autres bactériocines de bactéries lactiques sont utilisées sous forme de liquide de fermentation lyophilisé et elles sont vendues sous le nom de « shelf life extender ».

Le succès de la nisine a stimulé l'intérêt pour les bactériocines. Depuis une vingtaine d'années, on remarque l'accroissement important du nombre de publications sur les bactériocines des bactéries à Gram positif, en particulier les bactéries lactiques, dû à leur potentiel d'application dans le domaine alimentaire (Sahl *et al.* 1995).

### 1.3.2. BACTÉRIOCINES DES BACTÉRIES À GRAM POSITIF

Toutes les bactériocines sont produites par les ribosomes sous forme d'un précurseur peptidique qui est clivé afin de libérer la partie active. Fréquemment, cette étape a lieu durant le transport des peptides à l'extérieur de la cellule. Le peptide signal, qui est retranché durant ce processus, il rend probablement la bactériocine inactive à l'intérieur de la cellule et aide au transport de la bactériocine à l'extérieur. En plus, étant donné que la bactériocine est toxique pour la cellule productrice ainsi que pour les autres cellules, la cellule productrice possède un mécanisme d'autodéfense contre sa propre bactériocine (Jack et Jung, 1998).

Le terme bactériocine fut originellement défini par Jacob *et al.* en 1953 de façon très spécifique pour désigner des substances antibiotiques de nature protéique du type colicine produites par certaines souches de la famille des entérobactériacées. La synthèse de ces protéines serait létale pour la souche productrice et leur adsorption dépendrait de récepteurs spécifiques à la surface de la cellule cible. D'autres caractéristiques des bactériocines du type colicine sont: (a) masse moléculaire élevée; (b) spectre d'activité étroit (se limitant généralement à des souches de la même espèce ou d'espèces voisines) et; (c) déterminants génétiques portés par des plasmides (Tagg *et al.* 1976).

Il est évident, cependant, que la majorité des bactériocines produites par les bactéries à Gram positif ne s'intègrent pas dans la classification classique des bactériocines du type colicines, car ces substances ont:

- (a) un spectre d'activité plus étendu que celui des colicines;
- (b) leur synthèse n'est pas létale pour la souche productrice;
- (c) il n'y a qu'une très faible évidence que leur action débute par la fixation sur des récepteurs spécifiques;
- (d) les déterminants génétiques peuvent être plasmidiques, sur un transposon (nisine), ou être codés par le chromosome (Jack *et al.* 1995; Caufield *et al.* 1990). Il semble que l'interaction létale des bactériocines des bactéries à Gram positif avec les cellules sensibles dépend, en général, de la compatibilité entre les charges de surface et les domaines hydrophobes de la molécule (Tagg, 1992).

Étant donné que la définition du terme « bactériocine » était basée sur les colicines Tagg (1992) a proposé:

- (a) une re-définition du terme bactériocine pour les peptides et les protéines produites par les bactéries à Gram positif en tenant compte des caractéristiques différentes des colicines mentionnées ci-dessus ou;
- (b) l'utilisation du terme BLIS « **B**acteriocin-**L**ike **I**nhibitory **S**ubstances » pour désigner des peptides ou des protéines bactéricides excrétées à l'extérieur des cellules par des bactéries à Gram positif ou à Gram négatif, capables de tuer d'autres espèces bactériennes à très faibles concentrations.

Dans diverses publications scientifiques, des bactériocines portant différentes appellations s'avèrent, après caractérisation complète, posséder la même séquence en acides aminés et la même séquence nucléotidique correspondant au gène de structure (ex. pédiocine PA-1 et pédiocine AcH, épidermine et staphylococcine 1580, curvacine A et sakacine A, diplococcine et lactococcine A). Normalement, ses substances devraient avoir le même nom (le premier nom qui a été publié). Jack *et al.* (1995) ont proposé que le terme bactériocine ne soit utilisé qu'après que la séquence en acides aminés et la séquence nucléotidique correspondent au gène structural soient connues. Jusqu'à ce moment, le terme BLIS suivi du nom de la souche productrice devrait être employé.

On peut alors définir les bactériocines des bactéries à Gram positif comme étant des peptides antibiotiques synthétisés par les ribosomes (taille variée entre 19 et 40 acides aminés), possédant une partie biologiquement active de nature protéique, un mode d'action bactéricide contre des souches bactériennes apparentées ou non, pouvant ou non subir des modifications après traduction. Normalement, les cellules productrices sont immunes à l'action bactéricide de leur bactériocine.

### 1.3.3. NOMENCLATURE

La nomenclature des bactériocines, principalement celle des bactéries à Gram positif n'est pas très uniforme. Parfois le nom de la bactériocine est basé sur l'espèce et d'autre fois sur le genre des souches productrices (ex. bactériocines produites par *Staphylococcus aureus*: staphylococcines ou auréocines). Cependant, si on regarde la nomenclature utilisée pour les bactériocines classiques (les colicines), les bactériocines sont désignées préférentiellement par le nom spécifique de la bactérie productrice (ou les premières syllabes de ce nom), auquel on ajoute le suffixe « cine » (ex. Colicine: bactériocine produite par *Escherichia coli*, mutacine: bactériocine produite par *Streptococcus mutans*), ou encore par celui du genre (ou les premières syllabes de ce nom), auquel la désinence « cine » est ajoutée (Hamon, 1965). Afin de spécifier une bactériocine donnée, il a été suggéré d'incorporer la désignation de la souche productrice au nom de la bactériocine (ex. streptococcine A-FF22: bactériocine produite par la souche FF22 de *Streptococcus* du group A; Tagg *et al.* 1976).

### 1.3.4. CLASSIFICATION

Les bactériocines des bactéries à Gram positif sont produites par différentes espèces bactériennes. Leurs structures varient considérablement. Cependant, on peut les classer en deux groupes principaux, avec les bactériocines qui subissent des modifications après traduction (les lantibiotiques ou classe I) et celles qui ne sont pas modifiées (classes II, III et IV). Klaenhammer (1993) a réparti les bactériocines en quatre classes distinctes, selon leur taille, leur structure et leur mode d'action:

- (I) Classe I: lantibiotiques, petits peptides actifs sur les membranes contenant des acides aminés modifiés (non-usuels) après la traduction du pré-peptide(ex. les lanthionines). La nisine et l'épidermine sont des exemples de lantibiotiques. Cette classe sera décrite plus en détail un peu plus loin;
- (II) Classe II: bactériocines de petite taille (<10 kDa), thermostables, actives sur les membranes et ne contenant pas d'acides aminés non usuels. Cette classe se divise en trois sous-classes:

- (IIa) les peptides actifs contre *Listeria* ayant une séquence consensus « -Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys- » située dans la région aminée de la protéine mature, ex. pédiocine PA-1, sakacine A, sakacine P, leucocine A, curvacine A. Cependant, il y a plusieurs espèces de *Listeria* qui sont sensibles à ces bactériocines, tandis que d'autres y sont résistantes. Jusqu'à présent, le rôle exact de cette séquence consensus sur la sensibilité de *Listeria* sp. n'a pas été établi (Jack *et al.* 1995);
- (IIb) les bactériocines à deux peptides distincts nécessaires à leur activité, ex. lactococcine G, lactococcine M, et lactacine F;
- (IIc) les bactériocines pour lesquelles les résidus cystéines doivent être réduits pour que la bactériocine soit active. La lactococcine B est la seule bactériocine de ce groupe;
- (III) Classe III: bactériocines thermolabiles de masse moléculaire supérieure à 30 kDa, ex. helvécine J, helvécine V-1829, acidophilucine A, lactacines A et B;
- (IV) Classe IV: bactériocines complexes qui renferment en plus d'une portion protéique essentielle, une partie non-protéique (lipide ou hydrate de carbone) indispensable à l'activité, ex. plantaricine S, leuconocine S, lactocine 27, pédiocine SJ-1. Toutefois, il n'a pas encore été bien établi que la portion non-protéique fasse partie de la structure primaire ainsi que son rôle dans l'activité de ces antimicrobiens. La possibilité d'une contamination avec des préparations d'amylases ou de lipases n'a pas été exclue (Muriana et Klaenhammer, 1991). L'analyse chimique des antibactériens purifiés serait nécessaire pour confirmer l'importance de ces groupements dans l'activité biologique de ces bactériocines (Jack *et al.* 1995).

### 1.3.5. BACTÉRIOCINES VERSUS ANTIBIOTIQUES

La confusion des termes antibiotique et bactériocine est due au fait que les premières bactériocines (colicines) ont été découvertes durant l'ère des antibiotiques.

Les premières observations du phénomène antibiotique furent la découverte de la pénicilline, lorsque Alexander Fleming, en 1929, constata la lyse de staphylocoques par le contaminant, *Penicillium notatum*. À partir de 1939, la recherche extensive de molécules antibiotiques, surtout à partir des microorganismes du sol, a conduit à la découverte de

nombreuses molécules (plus de 6000) dont plusieurs sont utilisées en clinique de nos jours. Par contre, un nombre encore plus élevé de molécules ne sont pas utilisées, se révélant trop toxiques pour les animaux et les humains (Gootz, 1990).

Les différentes classes d'antibiotiques agissent à divers niveaux du métabolisme ou sur les mécanismes de la biosynthèse bactérienne (Neu, 1987), en perturbant: le métabolisme de l'acide folique menant à la synthèse des purines (sulfamides et triméthoprime); la réplication et la transcription de l'ADN en inhibant une des sous-unités de l'ADN gyrase (acide nalidixique et quinolones) ou l'ARN polymérase (rifampicines); la traduction en se fixant sur les sous-unités ribosomiques 30S ou 50S (aminosides-aminocyclitols tétracyclines, macrolides-lincosamides, chloramphénicol et acide fusidique); et l'élaboration des membranes en inhibant les enzymes responsables de la synthèse du peptidoglycane ( $\beta$ -lactamines et  $\gamma$ -lactamines) ou en se fixant à certaines enzymes membranaires (gramicidines, glycopeptides, lipoglycopeptides, bacitracines, fosfomycine et cyclosérine).

On peut définir les antibiotiques comme étant des substances, de nature protéique ou non, synthétisées par des microorganismes, capables, même en faible concentration, d'inhiber la croissance ou de tuer d'autres microorganismes. Cette définition inclut donc également les bactériocines. La plupart des antibiotiques sont produits par des *Actinomycetes*. Parmi les bactéries, le genre *Bacillus* produit des antibiotiques principalement de type peptidique (bacitracine, gramicidine, polymyxine-B).

La différence entre bactériocines et antibiotiques n'est pas bien établie. Pour les antibiotiques autres que ces de nature peptidique la question ne se pose pas. Cependant, la différenciation devient moins évidente entre les antibiotiques peptidiques et les bactériocines. Deux approches distinctives sont suggérées selon (i) leur application et (ii) leur voie de synthèse:



- (i) La première approche concerne surtout l'application de ces substances. Les antibiotiques seraient destinés à l'application clinique, tandis que les bactériocines à l'alimentaire. Les antibiotiques ont été pendant longtemps utilisés avec succès pour améliorer les performances zootechniques et sanitaires des animaux d'élevage. En fonction des conséquences liées à l'usage des antibiotiques dont la principale est le développement de bactéries résistantes, la législation est de plus en plus restrictive quant à leur utilisation comme facteur de croissance. Cependant, l'utilisation de la natamycine (ou pimaricine, antibiotique antifongique produit par *Streptomyces natalensis*) dans le fromage est encore acceptée. D'autre part, on constate de plus en plus la possibilité d'application des bactériocines dans un but thérapeutique. Par exemple, l'utilisation topique de l'épidermine et de la gallidermine contre l'acné; de la nisine dans les pâtes dentifrices, dans les cosmétiques, et contre les ulcères d'estomac. Alors, ce critère ne semble pas soutenir la différenciation entre antibiotiques et bactériocines.
- (ii) L'approche qui semble être actuellement la plus acceptée serait une distinction selon la voie de synthèse de ces substances. Aujourd'hui le terme « antibiotique » est plutôt employé lorsque les peptides sont synthétisés par un complexe multi-enzymatique et qu'ils ne sont pas codés par des gènes spécifiques. Le terme « bactériocine » est employé lorsque les peptides sont synthétisés par voie ribosomique et qu'ils sont codés par un gène spécifique (Sahl *et al.* 1995; Jack et Jung, 1998). Selon un point de vue biotechnologique, les peptides antibiotiques produits par un complexe multi-enzymatique sont ouverts à une variété de manipulations afin de produire de nouveaux composés antibiotiques. D'autre part, les peptides synthétisés par la voie ribosomique peuvent être altérés par mutagenèse dirigée afin d'améliorer, par exemple, leur production, leur stabilité ou leur activité.

## 1.4. LES LANTIBIOTIQUES

Les lantibiotiques sont des peptides antimicrobiens produits par voie de synthèse ribosomique du précurseur protéinique inactif (pré-lantibiotique). Après traduction, ils subissent des modifications enzymatiques dans la région C-terminale du pré-peptide (pro-lantibiotique) pour devenir un peptide polycyclique biologiquement actif suite au clivage protéolytique du peptide signal.

### 1.4.1. HISTORIQUE

La nisine, peptide pentacyclique produit par des souches de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (ancien *Streptococcus lactis*) fût le premier lantibiotique à être étudié. Elle est considérée comme le prototype des lantibiotiques de type A (voir section 1.4.3, classification). Découverte dans les années '40 (même si les premières observations d'antagonisme produit par *L. lactis* datent de 1928), plusieurs rapports sur la présence des lanthionines dans ce peptide sont apparus très tôt. Toutefois, ce fut dans les années '70 que sa structure a été élucidée par Gross *et al.* (1971) ainsi que celle de la subtiline, une substance proche de la nisine. Par la suite, plusieurs autres lantibiotiques ont été découverts. Cependant, le terme « lantibiotique » a été introduit par Schnell *et al.* (1988) pour l'abréviation des peptides antimicrobiens qui contiennent des lanthionines.

Dans la dernière décennie, le nombre de publications portant sur la description de nouveaux lantibiotiques a fortement augmenté. Ce fait est probablement dû à leur potentiel d'application dans différents domaines, soit alimentaire ou pharmaceutique. L'utilisation de la nisine comme bio-conservateur alimentaire, de l'épidermine comme agent thérapeutique contre l'acné et des duramycines comme agent immunorégulateur sont quelques exemples du potentiel d'application des lantibiotiques (Sahl *et al.* 1995; voir section 1.4.8), plusieurs autres exemples seront fournis dans la section « applications » qui suit (Section 1.4.8; Tableaux 1.3 et 1.4).

### 1.4.2. CARACTÉRISTIQUES

Les lantibiotiques, peptides polycycliques, classe I des bactériocines (Klaenhammer, 1993), sont produits par différents genres de bactéries à Gram-positif (staphylocoques, streptocoques, bacilles, lactocoques, lactobacilles, *Streptomyces*). Ils sont stables à la chaleur, ils ont une forte activité bactéricide et leur masse moléculaire est faible (inférieure à 5 kDa). Ces substances ont une structure typique qui contient, dans leur chaîne peptidique, de ponts intramoléculaires thioéthers soit la lanthionine (Lan) ou la  $\beta$ -méthyllanthionine (MeLan). Ils peuvent contenir aussi d'autres acides aminés non-usuels. Les acides aminés insaturés tel la  $\alpha,\beta$ -didéhydroalanine (dhA) et la  $\alpha,\beta$ -didéhydrobutyrine (dhB) sont normalement présents (Nes et Tagg, 1996). Selon les études publiées jusqu'à présent, toutes les cystéines du pro-peptide sont utilisées pour former des liens thioéthers avec le dhA ou le dhB; en d'autre mots, aucune cystéine libre ou sous forme de cystine (formé par deux résidus cystéines qui sont attachés par une liaison disulfure, n'est retrouvée dans le peptide mature (Nes et Tagg, 1996).

Une trentaine de lantibiotiques ont été caractérisés jusqu'à présent. Ils sont divisés en type A (molécules linéaires et flexibles) et type B (molécules globulaires et compactes; section 1.4.3; Jung, 1991a,b). Leurs principales caractéristiques sont résumées dans le tableau 1.1. La plupart des lantibiotiques caractérisés jusqu'à présent sont produits par des souches de staphylocoques et de streptocoques. Le regroupement des substances et leurs aspects structuraux sont fournis dans les sections 1.4.3 et 1.4.4. Plusieurs structures déjà établies sont présentés dans les figures 1.4 et 1.5. Toutefois, les informations portant sur la structure de plusieurs lantibiotiques demeurent encore incomplètes (ex. cytolysines L1 et L2, mutacine T8, carnocine UI49, staphylococcines C55 $\alpha$ , C55 $\beta$  et Au-26).

L'effet bactéricide de certaines bactériocines est dû à l'activité complémentaire de deux peptides (classe IIb) comme c'est le cas de la lactococcine G (Nissen-Meyer *et al.* 1992). Ce phénomène de synergie est retrouvé pour deux lantibiotiques: les cytolysines L1 et L2 (Gilmore *et al.* 1996) produites par *Enterococcus faecalis* et les staphylococcines C55 $\alpha$  et C55 $\beta$  produites par *Staphylococcus aureus* (Navaratna *et al.* 1998).

**Tableau 1.1. Liste et caractéristiques des lantibiotiques rapportés dans la littérature.**

Lantibiotique	Organisme producteur	Masse [Da]	# a.a. (a)	charge nette [pH 7,0] (b)	# total cycles (d)	Résidus modifiés				
						Lan	MeLan	dhA	dhB	autres
<b>Type A</b>										
Nisine A	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	3353	34	(+3)	5	1	4	2	1	0
Nisine Z	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	3330	34	(+3)	5	1	4	2	1	0
Subtiline	<i>Bacillus subtilis</i>	3317	32	(+2)	5	1	4	2	1	0
Épidermine (Staphylococcine 1580)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2164	22	(+3)	4	2	1	0	1	AviCys
Gallidermine	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	2164	22	(+3)	4	2	1	0	1	AviCys
[V],L6]-épidermine	<i>S. epidermidis</i>	2151	22	(+3)	4	2	1	0	1	AviCys
Mutacine B-Ny266	<i>Streptococcus mutans</i>	2270	22	(+3)	4	2	1	1	1	AviCys
Mutacine B-JH1140	<i>S. mutans</i>	2263	22	(+3)	4	2	1	1	1	AviCys
Mutacine B-III	<i>S. mutans</i>	2266	22	(+3)	4	2	1	1	1	AviCys
Pep5	<i>S. epidermidis</i>	3488	34	(+7)	3	2	1	0	2	Ob
Épicidine 280	<i>S. epidermidis</i>	3133	30	(+4)	3	1	2	0	1	Op/Hp
Épilancine K7	<i>S. epidermidis</i>	3032	31	(+5)	3	2	1	2	2	Hp
Lactocine S	<i>Lactobacillus sake</i>	3764	37	0	2	2	0	0	1	3 D-Ala, Op
Lacticine 481 (Lactococcine DR)	<i>L. lactis</i>	2901	27	0	3	2	1	0	1	0
Streptococcine A-FF22 (A ou SA-FF22)	<i>Streptococcus pyogenes</i>	2795	27	(+1)	3	1	2	0	1	0
Salivaricine A	<i>Streptococcus salivarius</i>	2315	22	0	3	1	2	0	0	0
[K2,F7]-Salivaricine A (Salivaricine A1)	<i>S. salivarius</i>	2321	22	0	3	1	2	0	0	0
Variacine	<i>Micrococcus varians</i>	2659	25 (d)	?	3	2	1	0	1	0
Cypémicine	<i>Streptomyces</i> sp.	2094	22	?	1	0	0	0	4	2 a Ile, AviCys Me2N-Ala

**Tableau 1.1. Liste et caractéristiques des lantibiotiques (suite)**

Lantibiotique	Organisme producteur	Masse [Da]	# a.a. (a)	charge nette [pH 7,0] (b)	# total cycles (d)	Résidus modifiés				
						Lan	MeLan	dhA	dhB	autres
<b>Type B</b>										
Cinnamycine (Lanthiopeptine, Ro 09-0198)	<i>Streptoverticillium</i>	2042	19	(+1)	4	1	2	0	0	HyD, LysN-A
Duramycine (Leucopeptine)	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>	2014	19	(+1)	4	1	2	0	0	HyD, LysN-A
Duramycine B	<i>Streptoverticillium</i> sp.	1951	19	(+1)	4	1	2	0	0	HyD, LysN-A
Duramycine C	<i>Streptomyces griseoluteus</i>	2008	19	0	4	1	2	0	0	HyD, LysN-A
Ancovenine	<i>Streptomyces</i> sp.	1959	19	0	3	1	2	1	0	0
Mersacidine	<i>Bacillus</i> sp.	1825	20	(-1)	4	0	3	1	0	AviMeCys
Actagardine (gardimycine)	<i>Actinoplanes</i> sp.	1890	19	(-1)	4	1	2	0	0	MeLanSO
<b>structure incomplète</b>										
Mutacine J-T8	<i>S. mutans</i>	3245	27 (d)	?	3	présent		présent		?
Carnocine UI49	<i>Carnobacterium piscicola</i>	4635	39 ?	?	2-3 ?	présent		présent		?
Cytolysine L1 (CyllL, CylA1)	<i>Enterococcus faecalis</i>	4164	44 (d)	0	3	présent		présent		?
Cytolysine L2 (CylLS, CylA2)	<i>E. faecalis</i>	2631	27 (d)	0	2	présent		présent		?
Staphylococcine Au-26	<i>Staphylococcus aureus</i>	2700	?	?	2-3 ?	présent		?	?	?
Staphylococcine C55 $\alpha$	<i>S. aureus</i>	3339	22 ?	?	3	présent		1	1	?
Staphylococcine C55 $\beta$	<i>S. aureus</i>	2993	24 ?	?	3	présent		0	2	?
Sublancine 168 (*)	<i>B. subtilis</i>	3877	37 (d)	(+3) ?	1 ?	0	1	1	0	?

(adapté de : Hillman *et al.* 1998; Jung, 1991a; Mota-Meira *et al.* 1997; Navaratna *et al.* 1998; Nes et Tagg, 1996; Paik *et al.* 1998; Qi *et al.* 1999b; Sahl *et al.* 1995; Sahl et Bierbaum, 1998; Scott *et al.* 1992)

**Lan**, lanthionine; **MeLan**,  $\beta$ -méthyllanthionine; **MeLanSO**, méthyllanthionine sulphoxyde; **D-Ala**, D-alanine; **a Ile**, *allo* isoleucine; **AviCys**, 2-aminovinyl-D-cystéine; **AviMeCys**, 2-aminovinyl-3-méthyl-D-cystéine; **LysN-A**, (2S, 8S)-lysinoalanine; **Me2N-Ala**, N-diméthylalanine; **dhA**, (2,3)-didéhydroalanine; **dhB**, (2,3)-didéhydrobutyrine; **HyN**, acide 3-*érythro*-hydroxyaspartique; **Ob**, 2-oxobutyryle; **Op**, 2-oxopropionyle; **Hp**, 2-hydroxypropionyle; (a) chaque pont a été compté comme étant 2 résidus; (b) charge nette incuant N- et C-terminal libre (non modifié); (c) cycles covalents incluant les ponts thioéthers (Lan, MeLan, MeLanSO, AviCys, AviMeCys); et aminoéthers (LysN-Ala); (d) déduit à partir du pro-peptide; (?), pas assez d'information; (\*) il semble que le peptide contient deux ponts disulfures dans sa structure.

### 1.4.3. CLASSIFICATION

Jung (1991a,b) a classé les lantibiotiques en deux types (A et B) basé tout d'abord sur leurs propriétés structurales définies par des cycles thioéthers et sur leur activité biologique. Le type A comprend les polypeptides linéaires, flexibles et amphipatiques qui forment des pores dans les membranes cytoplasmiques. Normalement, ils sont chargés positivement (pH 7,0) et ont une masse moléculaire comprise entre 2164 à 3488 Da (> 2 kDa). Le type B comprend des peptides polycycliques globulaires et rigides qui inhibent des fonctions enzymatiques spécifiques. Généralement, ils ont une faible charge nette positive ou négative (pH 7,0) ou ils ne sont pas chargés. Leur masse moléculaire est comprise entre 1825 à 2042 Da (< 2 kDa). En solution aqueuse, le type A est relativement non structuré. Dans les environnements plus lipophile, le type A adopte une conformation amphipatique de forme linéaire. Par contre, le type B adopte une conformation plus globulaire due aux ponts établis entre la tête et la queue du peptide (Jack et Sahl, 1995).

Sahl *et al.* (1995) ont proposé une sous-division dans la classification de Jung (1991a,b). Ce sous-groupe est basé sur la structure primaire des peptides. Cependant, avec l'apparition de nouveaux lantibiotiques, des caractéristiques intermédiaires à celles qui sont utilisées dans les définitions établies par Jung (1991a,b) sont également apparues. La classification des lantibiotiques devra donc être révisée pour tenir compte de ces nouvelles connaissances.

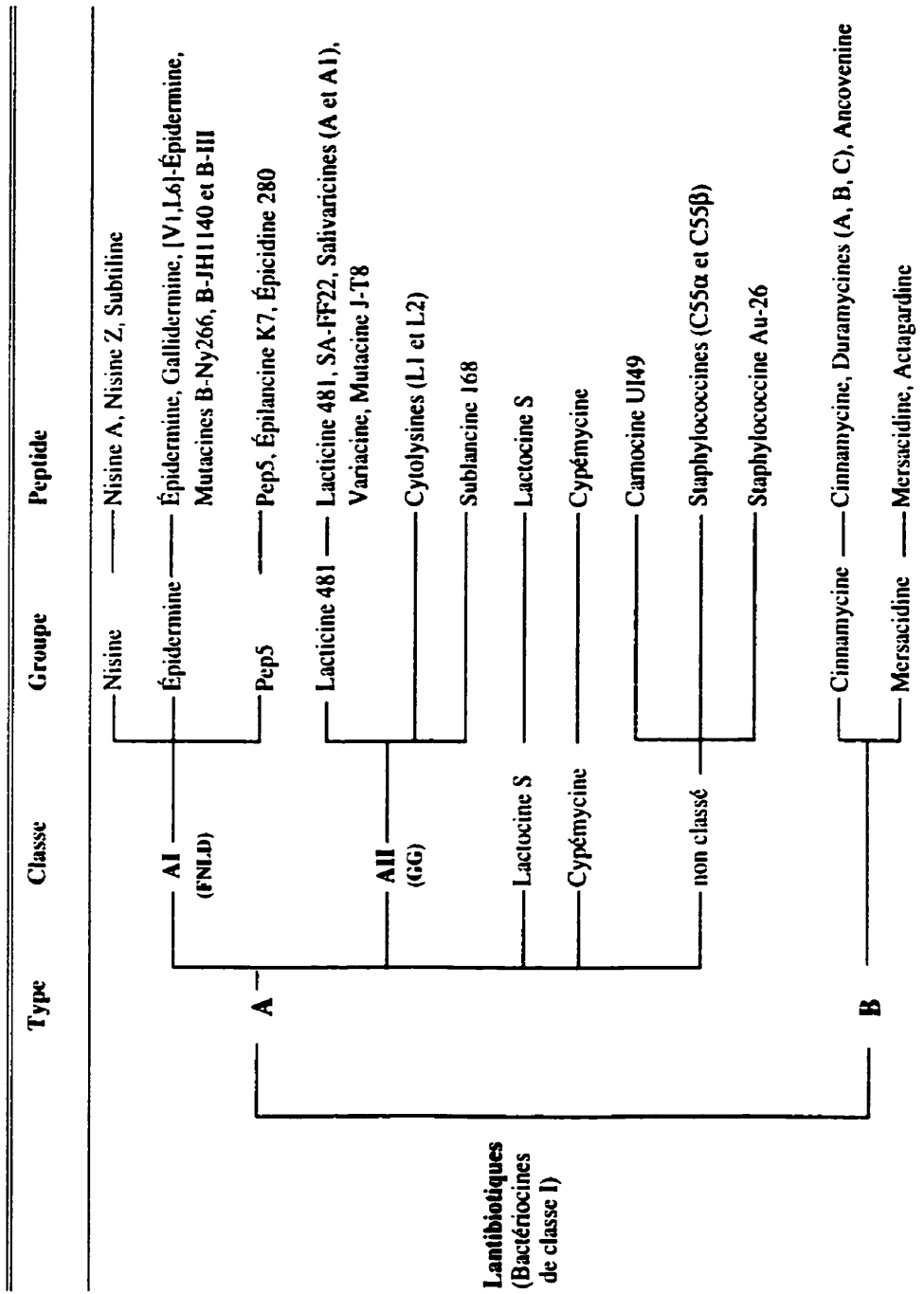
Dans une revue récente, Sahl et Bierbaum (1998) essaient de regrouper ces lantibiotiques toujours en type A et B. Ce regroupement est basé sur les caractéristiques générales et l'arrangement des cycles, ainsi que sur la similarité de la séquence primaire (séquence en acides aminés) des molécules de lantibiotiques, et de la séquence de l'ADN qui correspond au pré-peptide (peptide signal + pro-peptide). Un schéma de la classification des lantibiotiques est fourni à la figure 1.1.

**Figure 1.1. Schéma de la classification des lantibiotiques selon leur structure et leur séquence signal.**

Les nouveaux lantibiotiques dont le précurseur et la structure ne sont pas connus sont placés sous la dénomination «non classé»;

**FNLD**, séquence signal avec le motif FNLD (Fig. 1.2);

**GG**, séquence signal avec le motif double-glycines (Fig. 1.2). Ces lantibiotiques sont clivés en aval du doublet de glycine.



**Lantibiotiques  
(Bactériocines  
de classe I)**

(adapté de: de Vos *et al.* 1995; Hillman *et al.* 1998; Jung, 1991a; Klaenhammer, 1993; Mota-Meira *et al.* 1997; Navaratna *et al.* 1998; Paik *et al.* 1998; Qi *et al.* 1999a,b; Sahl et Bierbaum 1998; Sahl *et al.* 1995; Scott *et al.* 1992; Woodruff *et al.* 1998)



La comparaison entre la séquence signal et le pro-peptide démontre que la séquence N-terminale du pré-peptide est plus hydrophile et plus chargée que le pro-peptide. Contrairement au pro-peptide qui est riche en cystéine (Cys), la séquence signal ne possède aucun résidu Cys (de Vos *et al.* 1995). Deux classes de peptide signal ont été établies par de Vos *et al.* (1995) pour les lantibiotiques linéaires (type A) (Fig. 1.2). Cette classification a été basée sur la similarité de taille, de charge nette et de séquence du peptide signal. De plus, cette classification peut aussi être basée sur la conservation des gènes. Par exemple, les enzymes impliquées dans la déshydratation (LanB) des résidus Ser et Thr et dans la formation de ponts thioéthers (LanC) sont retrouvées dans tous les peptides de la classe AI. Tandis qu'une seule enzyme (LanM) est responsable pour ces deux fonctions dans les peptides de la classe AII. Les deux classes semblent avoir besoin de protéases (LanP) différentes pour le processus de clivage de la séquence signal: la classe AI constituée de protéases de la famille des sérine protéases et la classe AII d'autres sortes de protéases, plus spécifiques, qui n'appartiennent pas aux sérine protéases (Siezen *et al.* 1996).

**Figure 1.2. Comparaison des différents types de peptides signal chez les lantibiotiques et les bactériocines.**

( $\approx$ ), clivage; **Pre**, prépeptide; **Sgn**, séquence signal; **bloc noir**, résidus identiques; **bloc gris**, le résidu peut varier; (-), hiatus inséré lors de l'alignement multiple; (♣), LaPointe, information personnelle; (☆), même séquence signal pour la mutacine B-III; (# a.a.), nombre d'acides aminés.

Le regroupement des lantibiotiques de type A dans les classes AI et AII est basé sur la relation de la séquence spécifique du gène de structure (*lanA*) et de la structure du peptide mature;

**Type FNLD**: typique des peptides de la classe AI qui sont modifiés par LanB/LanC. Il a été d'abord décrit pour la nisine;

**Type GG**: typique des peptides de la classe AII; associé aux protéines LanM et au translocateur hybride protéase; caractérisé par un excès de Glu et Asp;

Les peptides signal de la cinnamycine (lantibiotique de type B) et de la mersacidine sont exceptionnellement longs. Ils diffèrent de ceux de type A. Cependant, plusieurs éléments du type GG y sont détectés; Les motifs « LT, EM/L, I/V et GG » sont retrouvés aussi dans les bactériocines de la classe II (non-lantibiotique) et dans la colicine V;

La séquence signal de la lactocine S est différente de celle des autres lantibiotiques de type A. Toutefois, le motif « ELS », caractéristique des peptides de la classe AII, y est présent et elle utilise l'enzyme LanM pour les modifications.



### 1.4.3.1. Lantibiotiques de type A

Les lantibiotiques de type A comprennent actuellement une vingtaine de substances différentes classées, selon le motif de leur séquence signal, en deux classes principales (Fig. 1.1): la classe AI (séquence signal avec le motif FNLD) formée par trois groupes de lantibiotiques soit le groupe nisine, le groupe Pep5 et le groupe épidermine, et la classe AII (séquence signal avec le motif GG) formée par le groupe lactocine 481, ainsi que les lantibiotiques cytolysines et sublancine. La lactocine S et la cypémicine forment des classes à part. Par manque d'information sur la séquence signal, la carnocine UI49 et les staphylococcines (C55 $\alpha$  et C55 $\beta$  et Au-26) ne sont pas encore classées.

La lactocine S ne fait pas partie de la classe AI ni de la classe AII (Fig. 1.1, 1.2). Elle possède très peu de ponts thioéthers (deux) et le N-terminal est bloqué par un oxopropionyle (Fig. 1.4 et 1.5; Tableau 1.1). Toutefois, sa charge nette à pH 7,0 est nulle (Tableau 1.1; Nes et Tagg, 1996), et aucune similarité de séquence n'est remarquée entre ce lantibiotique et le groupe Pep5 (Fig. 1.4 et 1.5). De plus, cette substance est le seul lantibiotique qui contient un résidu D-Ala dans sa structure (Fig. 1.3, 1.4 et 1.5; Tableau 1.1). La lactocine S semble avoir des caractéristiques intermédiaires entre les classes AI et AII. Elle n'a pas les motifs « FNLD » ni « GG » (Fig. 1.2). Elle utilise l'enzyme LanM dans le processus de modification et les protéines LanP et LanT dans le processus de clivage et de transport (Tableau 1.2; Sahl et Bierbaum, 1998). Bien que la séquence signal de la lactocine S ait un motif « ELS », elle n'a pas le motif « GG »; alors, ce peptide n'a pas le même système de clivage protéolytique que les lantibiotiques de la classe AII (de Vos *et al.* 1995).

La cypémicine constitue aussi une classe à part (Fig. 1.1 et 1.4). Elle contient seulement une cystéine dans le pro-peptide par conséquent un seul pont (AviCys) dans la région C-terminale (Fig. 1.4; Tableau 1.1). Elle contient quatre résidus dhB, deux résidus *allo*-isoleucine et le résidu N-diméthylalanine (M2N-Ala) en N-terminal qui bloque la dégradation d'Edman. Étant donné que la plus grande partie de la molécule ne forme pas de pont, ce peptide est beaucoup plus flexible que les autres lantibiotiques de type A. Cependant, ce

peptide, comme les lantibiotiques de type B, est produit par des souches de *Streptomyces* et a une taille similaire (Tableau 1.1; Sahl et Bierbaum, 1998).

#### 1.4.3.1.1. Classe AI

La classe AI est composée de peptides très cationiques, qui conservent le motif « FNLD » dans leur séquence signal (Fig. 1.2) et qui utilisent les enzymes LanB/LanC dans le processus de modification, LanP dans le processus de clivage protéolytique et les protéines LanT dans le processus de transport (Tableau 1.2). Les séquences signal sont généralement hydrophiles, légèrement chargées (positivement ou négativement) et conservent plusieurs résidus du motif « FNLD » entre les positions -15 à -21 de leur séquence (Sahl et Bierbaum, 1998). Une région homologe et chargée est aussi conservée autour du site de clivage: résidu polaire ou chargé positivement en position -1; Pro en position -2, à l'exception de l'épicidine 280 (Ala) et des mutacines B-Ny266 (Thr) (G. LaPointe, communication personnelle) et B-JH1140 (Thr) (Hillman *et al.* 1998); résidu polaire ou chargé négativement en position -3 et; résidu hydrophobe en position -4 (Fig. 1.2). D'après les résultats obtenus par la mutagenèse dirigée de la nisine et de la Pep5, le motif « FNLD » semble être impliqué dans les interactions avec les enzymes de modification et le système de transport (Sahl et Bierbaum, 1998). Par exemple, la substitution de la séquence signal de la nisine par celle de la subtiline résulte en nisine mature et active, ce qui permettrait d'échanger les séquences signal entre les peptides de la classe AI (de Vos *et al.* 1995).

Le groupe nisine est composé de la nisine (Gross et Morell, 1971) et de la subtiline (Gross *et al.* 1973). Les deux substances possèdent les quatre ponts thioéthers aux mêmes positions et leurs séquences ont une similarité de 60 %. La nisine Z (ou [N27]-nisine; Mulders *et al.* 1991) est un variant naturel de la nisine A (Fig. 1.1, 1.4 et 1.5; Tableau 1.1).

Le groupe épidermine est composé de substances qui ont une structure très proche (Fig. 1.1, 1.4 et 1.5). Elles possèdent quatre ponts thioéthers dont le dernier, situé en C-terminal (AviCis), est présent dans toutes les molécules (Fig. 1.3 et 1.4). Ce groupe comprend l'épidermine et ses variants, soit la gallidermine ([L6]-épidermine) et la [V1, L6]-épidermine.

Les mutacines B-Ny266, B-JH1140 et B-III font aussi partie de ce groupe. Tous les ponts sont conservés pour la mutacine B-Ny266 et les épidermines (Fig. 3.1). La région N-terminale de la mutacine B-Ny266 (les sept premiers résidus) est similaire à celle de la subtiline, avec des résidus Lys et dhA en position 2 et 5, respectivement (Fig. 1.4; Tableau 3.3). La séquence en acides aminés de la mutacine B-Ny266 diffère de celles de l'épidermine, de la gallidermine et de la [V1, L6]-épidermine par cinq résidus (positions 1, 2, 4, 5, 6) et des mutacines B-JH1140 et B-III par seulement deux résidus (positions 6 et 13). Cependant, la structure secondaire proposée pour la mutacine B-JH1140 (Hillman *et al.* 1998) diffère de celles de l'épidermine et de la mutacine B-Ny266 (voir Chap. III, Mota-Meira *et al.* 1997). Parmi les lantibiotiques de type A seulement les deux mutacines ont le résidu phénylalanine en position N-terminal. Les gènes codant pour la gallidermine (Schnell *et al.* 1989), les mutacines B-Ny266 (Mota-Meira *et al.* 1996), B-JH1140 (Hillman *et al.* 1998) et B-III (Qi *et al.* 1999b) sont localisés sur le chromosome, le gène de l'épidermine est plasmidique (Tableau 1.2; Schnell *et al.* 1992).

Le groupe Pep5 comprend trois substances: Pep5, épicide 280 et épilancine K7 (Fig. 1.1, 1.4 et 1.5). Ces peptides sont très chargés positivement (de +4 à +7; Tableau 1.1). Ils possèdent trois ponts thioéthers dans leur structure et la région N-terminale est bloquée par les groupements oxo-(ou hydroxy)-propionyle ou -butyryle (Fig. 1.3, 1.4 et 1.5). Le double pont dans la région C-terminale de l'épilancine K7 est similaire à ceux de la nisine et de la subtiline, avec un pont identique à celui de la subtiline (Fig. 1.4; Sahl et Bierbaum, 1998).

#### 1.4.3.1.2. Classe AII

La classe AII est composée de peptides légèrement chargés ou neutres qui conservent le motif « GG » dans leur séquence signal (Fig. 1.2) et qui utilisent les enzymes LanM dans le processus de modification, et des transporteurs hybrides ayant un domaine additionnel cystéine protéase dans les processus de clivage protéolytique et de transport (Tableau 1.2; Sahl et Bierbaum, 1998). Ils sont clivés après les « double glycines » et conservent une région homologue autour du point de clivage: résidu Ala, Ser ou Gly en position -1; résidu Gly en position -2 et résidu hydrophobe en position -4 (I/V). Les motifs « EL/EM » en positions -7 et -8, et « EVT/EVS/ELS » en positions -11 à -13 sont aussi conservés. La séquence signal

des peptides de la classe AII possède une très grande similarité avec celles des bactériocines du type II (pédiocine) et la colicine V, produite par *E. coli* (Fig. 1.2; de Vos *et al.* 1995). Basée sur ces similarités, l'hypothèse que ces peptides sont clivés durant leur exportation par des protéases ayant une spécificité et une localisation semblable a été émise. La réaction d'exportation est accomplie par un système chimérique de protéase de transport.

L'autre groupe de lantibiotiques qui comporte certaines homologues structurales est celui de la lacticine 481, formé par la lacticine 481, la streptococcine A-FF22, les salivaricines A et A1 ([K2, F7]- salivaricine A), la variacine, et la mutacine J-T8 (Fig. 1.1, 1.4). Seulement la structure primaire de la lacticine 481 a été déterminée (Fig. 1.5). À pH neutre, les membres de ce groupe peuvent ne pas être chargés ou posséder une charge nette négative ou légèrement positive (Tableau 1.1; Sahl et Bierbaum, 1998). Cependant, la plupart des substances contiennent des résidus His qui peuvent être protonés à un pH légèrement acide. L'analyse du pré-peptide, indique que ces substances font partie de la classe AII (Fig. 1.2).

Même si la sublancine 168, lantibiotique de la classe AII, semble avoir une similarité de séquence signal avec le groupe lacticine 481, cette molécule possède des caractéristiques différentes au niveau structural (Fig. 1.2). De plus, elle ne contient aucun résidu chargé négativement; elle est plutôt cationique avec ses trois résidus chargés positivement (Fig. 1.4: Tableau 1.1; Paik *et al.* 1998).

#### 1.4.3.2. Lantibiotiques de type B

Les lantibiotiques de type B sont constitués de deux groupes soit le groupe cinnamycine et celui de la mersacidine (Fig. 1.1). Le groupe cinnamycine se compose des variants naturels de cette molécule, les duramicines et l'ancovenine. La cinnamycine a été découverte en 1958, cependant sa structure n'a été complètement élucidée qu'en 1991 (Fredenhagen *et al.* 1991). Ces molécules ont la même taille (19 résidus) et elles ont une très grande similarité de séquence (Fig. 1.4; Tableau 1.1). Les trois ponts thioéthers sont conservés dans toutes les molécules. À l'exception de l'ancovenine, ces molécules ont un quatrième pont (lysinoalanine) formé entre les résidus Lys-19 et dhA-6 ainsi qu'un résidu HyAsp en position

15 (dans l'ancovenine le résidu Asp-15 n'est pas hydroxylé; Jung, 1991a). Contrairement aux lantibiotiques de type A, la formation de certains ponts est inversée, soit à partir des Cys N-terminales vers les didéhydro en C-terminal. Ces ponts entrelacés entre la tête et la queue des peptides leur confèrent une structure spatiale globulaire et rigide. Il semble que cette structure est responsable de la grande résistance de ces peptides aux protéases (Sahl et Bierbaum, 1998) (Fig. 1.4 et 1.5).

Bien que, initialement les lantibiotiques mersacidine et actagardine ne furent pas classés par Jung (1991a) ni en type A, ni en type B, des études plus récentes ont pu les regrouper parmi les lantibiotiques de type B (Fig. 1.1; Nes et Tagg, 1996). Ce sont des peptides anioniques qui ont une structure spatiale semblable à la cinnamycine (Fig. 1.3 et 1.4; Tableau 1.1). Ils possèdent trois ponts thioéthers dans leur structure. Cependant, l'actagardine a un quatrième pont en C-terminal (sulfoxyde méthyllanthionine) et la mersacidine a un petit pont en N-terminal. Comme l'épidermine, la mersacidine possède aussi un pont en C-terminal (AviMeCys) formé par la décarboxylation oxydative de la Cys-1 et du dhB-2. Les ponts B de l'actagardine (résidus 5-13) et le C de la mersacidine (résidus 11-18) sont presque identiques ne possédant qu'un résidu différent (Ile dans l'actagardine et dhA dans la mersacidine). Ce fait peut indiquer une relation étroite entre ces deux molécules qui peut se refléter dans leur mode d'action (inhibition de biosynthèse du peptidoglycane; Sahl *et al.* 1995).

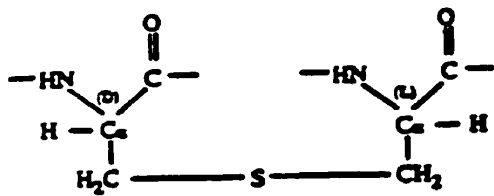
#### **1.4.4. ASPECTS STRUCTURAUX**

##### **1.4.4.1. Acides aminés non-usuels**

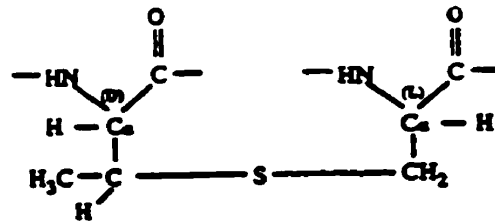
La figure 1.3 donne la structure des principaux acides aminés non-usuels retrouvés chez les lantibiotiques.



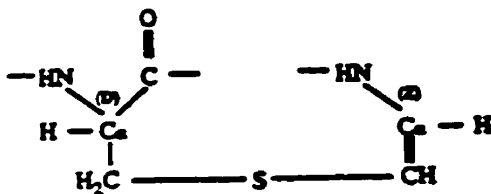
**Figure 1.3. Principaux acides aminés non-usuels et résidus dérivés des acides aminés retrouvés dans les lantibiotiques.**



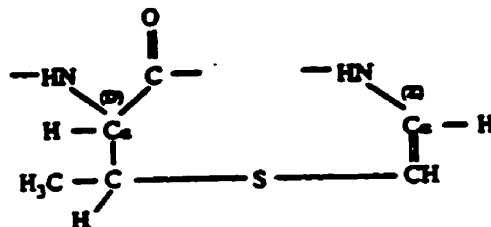
(2S,6R)-lanthionine; *meso*-lanthionine;  
Lan



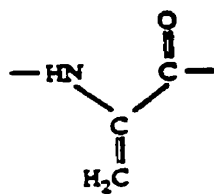
(2S,3S,6R)-3-méthyllanthionine;  
*threo*-β-méthyllanthionine; MeLan



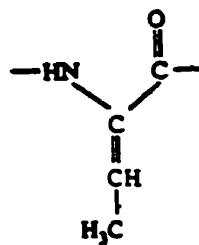
(S)-[(Z)-2-aminovinyl]-D-cystéine;  
AviCys



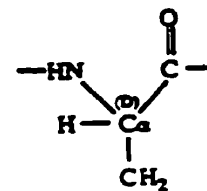
(S)-[(Z)-2-aminovinyl]-3-méthyl-D-cystéine  
AviMeCys



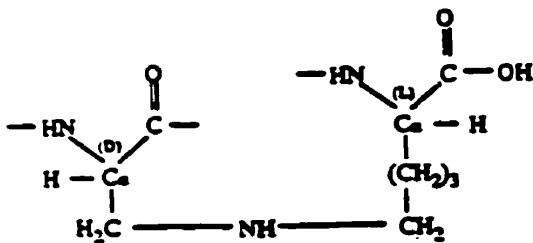
2,3-dihydroalanine;  
dhA; U



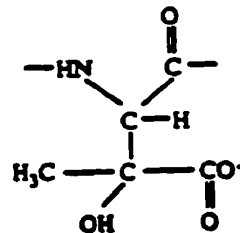
(Z)-2,3-dihydrobutyrine;  
dhB; O



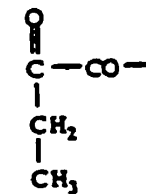
D-alanine;  
D-Ala



(2S,8S)-lysinoalanine;  
LysNAIa



acide *erythro*-3-hydroxy-L-aspartique;  
HyAsp



2-oxobutyrate  
Ob

(adapté de Jack et Sahl, 1995)

#### 1.4.4.2. Structure primaire des lantibiotiques

L'élucidation de la structure primaire des lantibiotiques est souvent problématique. Plusieurs acides aminés modifiés ne peuvent pas être détectés par les analyses de routine des acides aminés et de séquençage des peptides. De plus, ils ne peuvent pas être déduits à partir de la séquence des gènes. Les résidus modifiés situés dans la partie N-terminale (oxo/hydroxy-butyryle et -propionyle) et les résidus didéhydro (dhA et dhB) créent un problème analytique important car ils bloquent la dégradation d'Edman. Cependant, la méthode proposée par Meyer *et al.* (1994) permet de contourner ce problème. La séquence du peptide par la dégradation d'Edman devient possible suite à une série de modifications chimiques du lantibiotique. Le traitement des lantibiotiques avec un mélange alcalin d'éthanethiol permet la formation de dérivés stables à partir de la conversion des résidus insaturés et du clivage des résidus thioéthers. Les résidus situés en N-terminal sont enlevés par le clivage oxydatif avec l'acide trifluoroacétique. Cependant, ce procédé ne révèle pas la nature exacte des résidus modifiés, il donne plutôt des informations sur leur position. La séquence partielle du peptide et la séquence des gènes fournissent ensemble plusieurs indications sur la structure primaire du peptide. Cependant, la fragmentation protéolytique, lorsque le peptide est connu, peut donner des informations sur les résidus qui participent à la formation des ponts thioéthers (Sahl et Bierbaum, 1998). La structure de la nisine par exemple a été déterminée par la combinaison de méthodes chimiques et enzymatiques (Gross et Morell, 1971). La structure primaire de plusieurs lantibiotiques a été confirmée à l'aide de spectres RMN (résonance magnétique nucléaire; van de Ven et Jung, 1996). La combinaison de différentes méthodes est aussi utilisée pour déterminer la structure primaire des molécules et la localisation exacte des ponts thioéthers (van de Ven et Jung, 1996). Pour la lacticine 481, la combinaison des méthodes suivantes a été utilisée: l'analyse des acides aminés, la spectrométrie RMN et la séquence du gène structural (van den Hooven *et al.* 1996). La combinaison des spectrométries RMN et de masse (MS) a été utilisée pour déterminer directement la structure de l'actagardine (Zimmermann *et al.* 1995), tandis que la structure de l'épilancine K7 a été déterminée uniquement par RMN (van de Kamp *et al.* 1995).

La structure primaire de plusieurs lantibiotiques (localisation de ponts thioéthers et des résidus didéhydro) est encore incomplète. Toutefois, la séquence du pré-peptide (peptide signal + pro-peptide) est déjà connue pour plusieurs (cytolysines, mutacine J-T8, SA-FF22, salivaricines, variacine et sublancine 168; Fig. 1.2 et 1.4). Le pro-peptide Cytolysine L1 est le plus long des lantibiotiques avec 44 résidus, tandis que le pro-cytolysine L2 a 27 acides aminés (Fig. 1.4). La structure de la sublancine 168 a été partiellement élucidée (Paik *et al.* 1998). Le pro-peptide contient cinq Cys et seulement un résidu Cys est utilisé pour former une MeLan avec un dhB. Il semble que les quatre autres résidus forment des ponts disulfures entre eux, ce qui serait unique pour les lantibiotiques (Fig. 1.4). Pour d'autres lantibiotiques comme la carnocine UI49, seulement la séquence des sept premiers résidus a été publiée. Cependant, par la modification de la dégradation d'Edman, il semble que le peptide aurait 39 résidus (Nes et Tagg, 1996). Pour la staphylococcine Au-26, seulement le premier résidu (Ile) a été séquencé car la dégradation d'Edman a été bloquée à la deuxième position. Cependant, il semble que la molécule contient de 2 à 3 cycles thioéthers (déterminé par l'analyse des acides aminés avec la dérivation à l'*o*-phthaldialdéhyde (OPA); Scott *et al.* 1992). Dans le cas des staphylococcines C55 $\alpha$  et C55 $\beta$  produites par *Staphylococcus aureus* (Navaratna *et al.* 1998), la détermination des trois cycles thioéthers pour chacun de peptides a été effectuée par l'analyse des acides aminés avec la dérivation d'OPA. La dérivation chimique proposée par Meyer *et al.* (1994) suivie de la dégradation d'Edman a permis de déterminer la présence de deux résidus déshydratés pour chacune des deux staphylococcines (Navaratna *et al.* 1998).

La séquence en acides aminés des pro-lantibiotiques, ainsi que la structure des peptides matures, s'il y a lieu, sont présentées à la figure 1.4. Les lantibiotiques ont été divisés par types (A et B), par classes (AI et AII) et par groupes. Pour les duramycines et la cinnamycine dont les résidus modifiés et leur positions sont les mêmes, ces résidus sont représentés une seul fois. Dans le cas des lantibiotiques de type A, classe AII et groupe lacticine 481, seulement la séquence de la lacticine est représentée avec les résidus modifiés. Cependant, ces acides aminés modifiés semblent être localisé dans des positions semblables pour tous les membres de ce groupe. Nous avons utilisé le code des acides aminés à une lettre (voir la liste d'abréviations) dans les séquences du pro-peptide. Les acides aminés à l'intérieur des blocs gris sont des résidus susceptibles de subir des modifications après traduction. Pour les

cytolysines, tous les résidus Ser, Thr et Cys (qui peuvent ou non être transformés après traduction) sont représentés en caractère gras. Nous avons représenté les cycles (thioéthers, aminoéthers, etc) dans le peptide mature par des résidus Cystéines (C) liés par des flèches aux résidus dhA (U) et dhB (O) dans le cas de la lanthionine et de la méthyllanthionine par exemple. Le sens de la flèche indique la direction de formation des ponts (qui débutent toujours par les résidus Cys). Lorsque la localisation des ponts thioéthers dans le peptide mature n'est pas confirmée, nous pouvons les représenter par les résidus formés dans la première étape de modification (U ou O).

La structure primaire des principaux groupes de lantibiotiques est présentée à la figure 1.5. Parmi les lantibiotiques de type A, nous retrouvons la nisine, l'épidermine et la Pep5 (classe AI), la lacticine 481 (classe AII) et la lactocine S. Parmi les lantibiotiques de type B, nous retrouvons la mersacidine, l'actagardine et la cinnamycine.

**Figure 1.4. Longueur du peptide signal et du pré-peptide; séquence des pro-peptides et des peptides mature (avec les modifications après traduction) pour différents lantibiotiques de types A et B.**

( $\approx$ ), clivage; (☆), séquence en acides aminés du peptide mature seulement; (~), utilisé comme élément de liaison entre les résidus qui ont été alignés; (x), résidu non déterminé; (nc), non connu; ( $\rightarrow$ ), indique la direction de formation de pont thioéther débutant par L-Cys; **Ob**, 2-oxobutyryle; **Op**, 2-oxopropionyle; **Hp**, 2-hydroxypropionyle; **U**, dhA; **O**, dhB; **U-C**, Lan (Ala-S-Ala); **O-C**, MeLan (Abu-S-Ala); **U-C\***, AviCys; **O-C+**, AviMeCys; **O-(S=O)-C**, MeLan sulfoxyde (Abu-SO-Ala ou MeLanSO); **D+**, 3-érythro-hydroxyaspartate (HyAsp); **aI**, alloisoleucine (*alle*); **U-HN-K**, lysinoalanine (LysN-Ala); **DA**, D-Alanine; (**C-S-S-C**), pont disulfure; **M2NA**, N-diméthylalanine (M2N-Ala); **Bloc gris**, résidus susceptible de subir des modifications après la traduction; (**# a.a.**), nombre d'acides aminés; **Pré**, pré-peptide; **Pro**, pro-peptide.

Lantibiotique	(# a.a.)	pré	pro	Pro-peptide
<b>Type A</b>				
<b>Classe AI</b>				
Nisine A / Z	57	34	×	I T S I S L C T P G C K T G A L M G C N M K T A T C H / N C S I H V S K $O_2$ U <sub>5</sub> O <sub>25</sub> ← C <sub>28</sub> U <sub>33</sub> U <sub>3</sub> ← C <sub>7</sub> O <sub>8</sub> ← C <sub>11</sub> O <sub>13</sub> ← C <sub>19</sub> O <sub>23</sub> ← C <sub>26</sub>
Subtiline	56	32	×	W K S E S L C T P G C V T G A L Q T C F L Q T L T C N C K I S K U <sub>5</sub> O <sub>18</sub> O <sub>25</sub> ← C <sub>28</sub> U <sub>31</sub> U <sub>3</sub> ← C <sub>7</sub> O <sub>8</sub> ← C <sub>11</sub> O <sub>13</sub> ← C <sub>19</sub> O <sub>23</sub> ← C <sub>26</sub>
Épidermine / (Gallidermine) ([V1,L6]-Épidermine)	52	22	×	I A S K F I L C T P G C A K T G S F N S Y C C O <sub>14</sub> U <sub>19</sub> ← C* <sub>22</sub> U <sub>3</sub> ← C <sub>7</sub> O <sub>8</sub> ← C <sub>11</sub> U <sub>16</sub> ← C <sub>21</sub>
Mutacine B-Ny266	63	22	×	F K S W S F C T P G C A K T G S F N S Y C C U <sub>5</sub> O <sub>14</sub> U <sub>19</sub> ← C* <sub>22</sub> U <sub>3</sub> ← C <sub>7</sub> O <sub>8</sub> ← C <sub>11</sub> U <sub>16</sub> ← C <sub>21</sub>
Mutacine B-JH1140	63	22	×	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S Y C C U <sub>3</sub> O <sub>8</sub> U <sub>19</sub> ← C* <sub>22</sub> U <sub>3</sub> ← C <sub>7</sub> C <sub>11</sub> ← O <sub>14</sub> U <sub>16</sub> ← C <sub>21</sub>
Mutacine B-III	63	22	×	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S Y C C U <sub>5</sub> O <sub>14</sub> U <sub>19</sub> ← C* <sub>22</sub> U <sub>3</sub> ← C <sub>7</sub> O <sub>8</sub> ← C <sub>11</sub> U <sub>16</sub> ← C <sub>21</sub>
Pep5	60	34	×	T A G P A I R A S V K Q C Q K T L K A T R L F T V S C K G K N G C K O <sub>bl</sub> U <sub>9</sub> ← C <sub>13</sub> O <sub>16</sub> O <sub>20</sub> O <sub>24</sub> ← C <sub>27</sub> U <sub>26</sub> ← C <sub>33</sub>
Épicidine 280	56	30	×	S L G P A I K A T R Q V C - - - P K A T R F V T V S C K - K S D C Q H <sub>pl</sub> U <sub>9</sub> ← C <sub>13</sub> O <sub>17</sub> O <sub>21</sub> ← C <sub>24</sub> U <sub>21</sub> ← C <sub>29</sub>
Épilancine K7	55	31	×	S A S V L K T S I K V S K K Y C K G V T L T C G C N I T G G K H <sub>pl</sub> U <sub>3</sub> O <sub>7</sub> O <sub>8</sub> U <sub>12</sub> ← C <sub>16</sub> O <sub>20</sub> ← C <sub>23</sub> O <sub>28</sub> O <sub>22</sub> ← C <sub>25</sub>

FIGURE 1.4. Pro-peptides et peptides mature (suite)

Lantibiotique	(# a.a.) pré pro-x	Pro-peptide
<b>Classe AII</b>		
Lacticine 481	51 27x	- K G G S G V I H T I S H E C N M N S W Q F V F T C C S <div style="text-align: center;"> <math>O_9 \leftarrow C_{14}</math>  <math>U_{18} \leftarrow C_{26}</math>  <math>U_{11} \leftarrow C_{25}</math> </div>
SA-FF22	51 26x	- - G K N G V F K T I S H E C H L N T W A F L A T C C S
Variacine	47 25x	- - - G S G V I P T I S H E C H M N S F Q F V F T C C S
Salivaricine A / A1	51 22x	- K R / K G S G W I F A T I T S D D C P - N S V - F V - - C C
Mutacine T8	53 27x	N R W W Q G V V P T V S Y E C R M N S W Q H V F T C C
Cytolysine L1	68 44x	G D V Q A E T T P V C A V A A T A A A S S A A C G W V G G G I F T G V T V V V S L K H C
Cytolysine L2	63 27x	G D V Q A E T T P A C F T I G L G V G A L F S A K F C
Sublancine 168	56 37x	G L G K A Q C A A L W L Q C A S G G T I G C G G G A V A C Q N Y R Q F C R <div style="text-align: center;"> <math>U_{16} \quad O_{19} \leftarrow C_{22}</math>  <math>C_7 \text{-----} (S-S) \text{-----} C_{36}</math>  <math>C_{14} \text{-----} (S-S) \text{-----} C_{29}</math> </div>
Lactocine S	68 37x	S T P V L A S V A V S M E L L P T A S V L Y S D V A G C F K Y S A K H H C <div style="text-align: center;"> <math>O_{p1} \quad O_2 \quad D_{A7} \quad D_{A11} \quad D_{A19} \quad U_{23} \leftarrow C_{28} \quad U_{32} \leftarrow C_{37}</math> </div>
Cypémicine ☆	nc 22x	M <sub>2</sub> N <sub>A1</sub> O <sub>2</sub> P A O <sub>5</sub> P O <sub>7</sub> V A Q F V a I Q G S O <sub>17</sub> a I U L V C <div style="text-align: center;"> <math>U_{19} \leftarrow C^{*22}</math> </div>
Carnocine U149 ☆	nc nc x	G S E I Q P R
Staphylococcine C55α ☆	nc nc x	X X O <sub>3</sub> N X F U <sub>7</sub> L X D W W G N K G N W X X A A
Staphylococcine C55β ☆	nc nc x	G O <sub>2</sub> X L A L L G G A A O <sub>13</sub> G V I G W I X N Q W X P

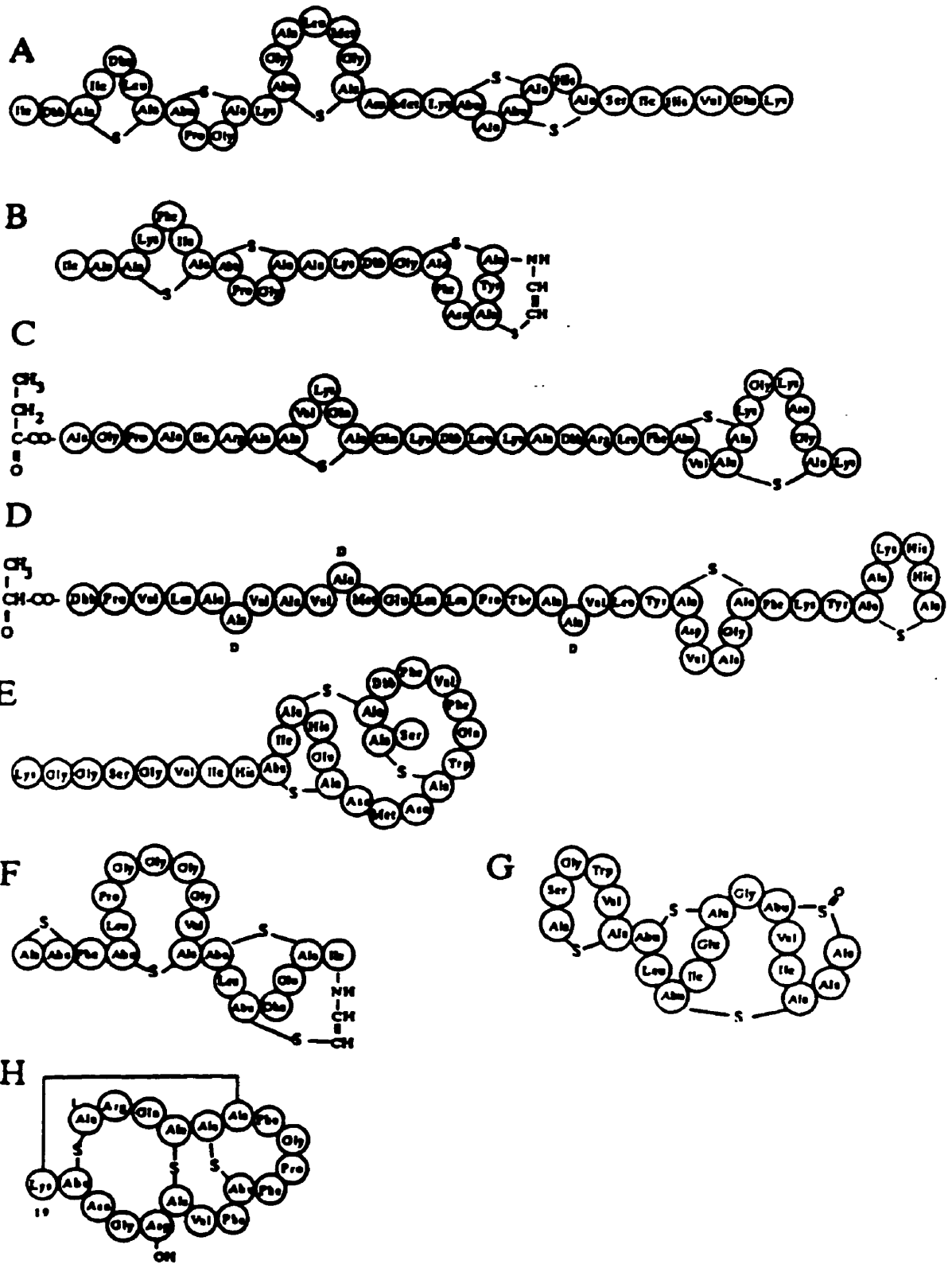




**Figure 1.5. Structures représentatives des principaux lantibiotiques.**

Lantibiotiques de type **A**, groupe de peptides ayant une structure linéaire et flexible: (A) nisine, (B) épidermine, (C) Pep5 et (D) lactocine S; et groupe de peptides ayant une structure constituée de ponts entrelacés en C-terminal et pas de pont en N-terminal: (E) lacticine 481.

Lantibiotiques de type **B**, peptides ayant une conformation globulaire et compacte: (F) mesarcidine, (G) actagardine et (H) cinnamycine.



(adapté de Sahl et Bierbaum, 1998)

### 1.4.4.3. Synthèse des acides aminés non-usuels

Les lantibiotiques contiennent de 19 à 40 acides aminés (basé sur les informations disponibles jusqu'à présent). Le pourcentage des résidus impliqués dans les modifications varie de 24 % pour la lactocine S à 47 % pour le groupe cinnamycine. Ce nombre de modification après traduction est basé surtout sur trois acides aminés: Ser, Thr (résidus hydroxyles) et Cys (résidus sulfhydryles). Dans très peu de cas, les résidus Lys, Asp et Ile subissent des modifications. La réaction clé est la déshydratation sélective de Ser et Thr dans le segment pro-peptide (C-terminal) du pré-lantibiotique. Les enzymes qui catalysent ces réactions ont été identifiées (voir section 1.4.5), par contre la biochimie d'élimination des molécules d'eau n'est pas encore bien établie. Les acides aminés  $\alpha,\beta$ -insaturés résultants de cette déshydratation, la didéhydroalanine (dhA de Ser) et la didéhydrobutyrine (dhB de Thr), sont les cibles pour les additions nucléophiles. Cependant, le nombre de réactions est normalement inférieur au nombre de résidus didéhydro, par conséquent on peut retrouver un ou plusieurs acides didéhydroamino dans les lantibiotiques matures (Sahl et Bierbaum, 1998).

La réaction la plus répandue est l'addition des groupements thiols (SH) des cystéines voisines aux doubles liaisons des résidus dhA et dhB pour former les acides aminés thioéthers stables, soit la lanthionine (Lan) et la  $\beta$ -méthyllanthionine (MeLan) (Fig. 1.6). Les enzymes LanB et LanC sont, généralement, responsables de ces modifications. Pour certaines souches bactériennes, LanM est la seule enzyme responsable des modifications (Kupke et Götz, 1996).

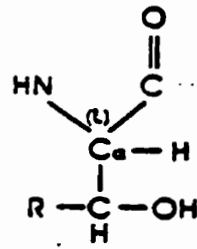
**Figure 1.6. Mécanisme de formation des lanthionines durant la maturation des antibiotiques.**

Les lanthionines sont formées en deux étapes durant la biosynthèse et la maturation des antibiotiques:

(1<sup>ère</sup>) déshydratation des résidus hydroxyles (Ser et Thr) localisés dans le pro-peptide (catalysée par l'enzyme LanB);

(2<sup>ème</sup>) addition stéréospécifique des groupements thiols de cystéines voisines (catalysée par l'enzyme LanC) pour former les résidus lanthionine et  $\beta$ -méthyllanthionine.

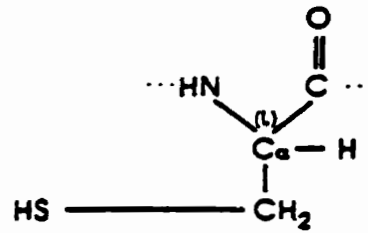
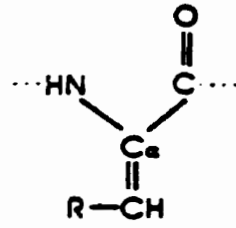
Ces deux étapes peuvent être catalysées par LanM dans le cas des antibiotiques de type AII.



R = H ; (L)-sérine  
 R = CH<sub>3</sub> ; (L)-thréonine

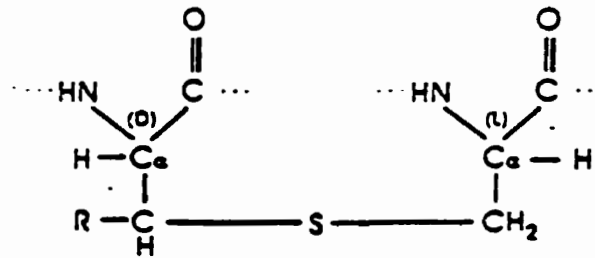
Déshydratation  
 (LanB)  
 H<sub>2</sub>O

Formation des ponts thioéthers  
 (LanC)



R = H ; 2,3-didéhydroalanine  
 R = CH<sub>3</sub> ; (Z)-2,3-didéhydrobutyrine

(L)-cystéine



R = H ; *meso*-lanthionine  
 R = CH<sub>3</sub> ; *threo*-β-méthyllanthionine

(adapté de Jack et Sahl, 1995)

Dans plusieurs lantibiotiques, les résidus Cys sont localisés en C-terminal (Fig. 1.4). Ils peuvent être oxydés et décarboxylés avant l'addition électrophile de leurs groupements thiol au dhA et au dhB pour former respectivement le 2-aminovinyl-D-cystéine (AviCys) dans le groupe épidermine (Bierbaum *et al.* 1996) et de la cypémicine (Minami *et al.* 1994) et, le 2-aminovinyl-3-méthyl-D-cystéine (AviMeCys) chez la mersacidine (Fig. 1.7; Kogler *et al.* 1991). L'enzyme LanD est responsable de cette modification (Kupke et Götz, 1996).

Le groupement  $\epsilon$ -amino de la Lys peut être aussi additionné au dhA pour former le pont lysinoalanine (LysN-Ala) dans la cinnamycine et les duramycines (Zimmermann *et al.* 1993). Le pont formé entre le résidu situé dans la partie C-terminale et celui qui est en position 6 contribue à la structure globulaire des lantibiotiques de type B (Fig. 1.4 et 1.5).

La lactocine S contient des D-Ala dans sa structure, bien que le pro-peptide contienne la L-Ser dans les positions respectives (Fig. 1.4). Dans ce cas particulier (Gilmore *et al.* 1996), la double liaison du dhA est modifiée par l'addition d' $H_2$  (hydrogénation stéréospécifique) pour former le D-Ala. L'enzyme responsable de cette modification n'est pas encore connue (Kaiser *et al.* 1998).

Lorsque les résidus déshydratés sont situés en première position (+1) dans le peptide mature, ils sont instables. Ils sont spontanément désaminés pour former les résidus 2-oxopropionyle (Op) et 2-oxobutyryle (Ob) retrouvés respectivement dans la lactocine S (Skaugen *et al.* 1994) et Pep5 (Kellner *et al.* 1991). Dans le cas de l'épilancine K7 (van de Kamp *et al.* 1995; Skaugen *et al.* 1994) et probablement de l'épicidine 280 (Sahl et Bierbaum, 1998), l'oxopropionyle est réduit pour former le résidu 2-hydroxypropionyle (Hp). La réaction d'hydroxylation est probablement induite par une enzyme, cependant, celle-ci n'a pas encore été mise en évidence (van de Kamp *et al.* 1995). L'enzyme EciO est probablement impliquée dans la réduction du groupement oxopropionyle en N-terminal (Heidrich *et al.* 1998).

**Figure 1.7. Mécanisme de formation de l'aminovinyl-D-cystéine (AviCys).**

Modèles de la modification en C-terminal de lantibiotiques du groupe épidermine et le rôle de la flavoprotéine EpiD.

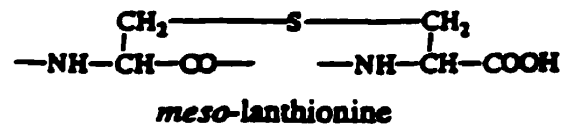
Modèle 1: la *meso*-lanthionine en C-terminal du précurseur partiellement modifié sert de substrat pour EpiD;

Modèle 2: le résidu Cystéine non modifié en C-terminal sert de substrat pour l'EpiD.

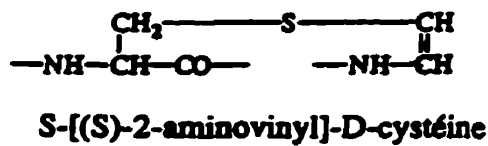
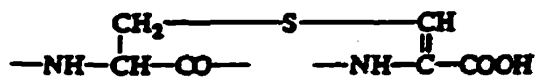
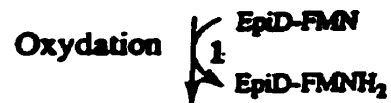
Dans les deux cas, la réaction 1 est l'oxydation et la réaction 2 la décarboxylation.



## Modèle 1

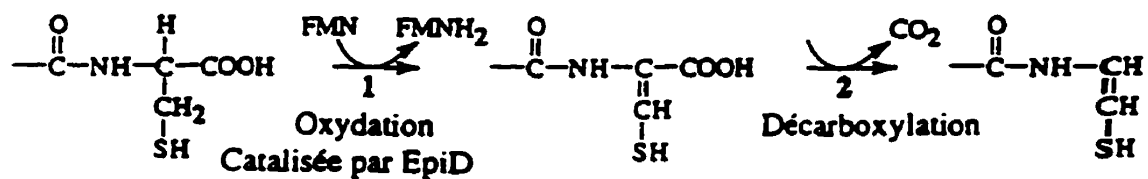


[groupe thiol de la Cys<sup>+22</sup> additionné à didéhydroalanine<sup>+19</sup>]



## Modèle 2

- Cys<sup>+21</sup>- Cys<sup>+22</sup>



(adapté de Kupke et Götze, 1996)

Le résidu situé dans la partie N-terminale de la cypémicine est doublement méthylé (N-diméthylalanine) et il bloque la dégradation d'Edman (Minami *et al.* 1994). Ce peptide contient aussi deux résidus *alloisoleucine* (aIle). Une autre modification non-usuelle survient pour la cinnamycine où le résidu Asp en position 15 est hydroxylé en *erythro*-3-hydroxy aspartate (Sahl et Bierbaum, 1998). Un autre acide aminé rare, retrouvé seulement dans l'actagardine, est formé par l'oxydation du résidu thioéther (MeLan), situé en C-terminal, en groupement sulfoxyde (MeLanSO) (Sahl *et al.* 1995). Toutefois, la façon dont ces modifications sont effectuées dans le peptide mature n'est pas encore connue.

Les bactéries à Gram-négatif ne sont pas reconnues pour produire des lantibiotiques. Cependant, on retrouve des modifications après la traduction chez la microcine B17 (Kaiser *et al.* 1998). Celle-ci pourrait être considérée comme un analogue des lantibiotiques. Les résidus Ser et Cys, chez la microcine B17, subissent des modifications plutôt dans la chaîne principale du peptide que dans les chaînes latérales comme pour la plupart de lantibiotiques. Les groupements sulfhydryles et hydroxyles sont additionnés aux carbonyles adjacents des résidus Gly résultant en la formation des cycles oxazoles et thiazoles (Sahl et Bierbaum, 1998).

#### 1.4.4.4. Rôle des acides aminés non-usuels

Le rôle de plusieurs acides aminés rares n'est pas encore bien établi. L'étude du rôle des résidus modifiés est réalisée par la technique de mutagenèse dirigée, soit le remplacement d'un seul acide aminé modifié dans le peptide (Sahl et Bierbaum, 1998). Les structures cycliques (les liens covalents) stabilisent la conformation bactéricide des lantibiotiques, car la rupture des cycles thioéthers entraîne souvent une dégradation protéolytique rapide (Jung, 1991a). Pour la Pep5, la structure thioéther (3<sup>ème</sup> pont) confère à la molécule une protection additionnelle contre la dégradation par des protéases (Kuipers *et al.* 1996). La formation des cycles A et B pour l'épidermine est importante pour la biosynthèse et la production de l'épidermine. Des mutations dans les cycles C et D entraînent une absence de production de l'épidermine (Kuipers *et al.* 1996).

Les régions qui contiennent les résidus didéhydro (dhA et dhB) semblent être importantes pour l'activité biologique des lantibiotiques. L'addition ou la soustraction de ces résidus peut augmenter ou réduire leur activité (Kuipers *et al.* 1996). Dans le cas de la subtiline, ainsi que de la nisine, la didéhydroalanine en position 5 (dhA-5) est importante pour l'activité biologique, puisque le mutant dhA-5-Ala ne démontre aucune activité contre la croissance des spores de *B. subtilis* (Liu et Hansen, 1992). Cependant, il a été conclu que le dhA-5 et le dhA-33 ne sont pas essentiels pour l'activité de la nisine contre des cellules végétatives, la substitution de ces deux résidus par l'Ala n'altère pas l'activité de la nisine (Kuipers *et al.* 1996).

### 1.4.5. BIOSYNTHÈSE DES LANTIBIOTIQUES

Les lantibiotiques sont synthétisés par les ribosomes sous forme non active de précurseur peptidique ou pré-peptide lequel est codé par le gène de structure *lanA* (le symbole *lan* est utilisé pour représenter les gènes de différents lantibiotiques). Le pré-peptide contient une extension N-terminale appelée séquence signal ou peptide signal. Cette séquence est clivée lors de l'exportation. Le domaine C-terminal qui suit le peptide signal est le pro-peptide. Il contient des résidus sérine (Ser), thréonine (Thr) et cystéine (Cys) qui, après traduction, subissent des modifications enzymatiques. Après avoir été traduit, le précurseur peptidique est mûri en trois étapes principales: modification du pro-peptide (formation de résidus non-usuels, par exemple, les résidus didéhydro ou déshydratés et les ponts thioéthers), clivage du peptide signal et exportation du peptide à l'extérieur de la cellule.

#### 1.4.5.1. Modification

La modification du pré-peptide est effectuée par des enzymes spécifiques: les résidus Lan et MeLan sont introduits dans le pré-peptide par deux étapes de modifications tel que proposé par Ingram (1969). Selon les analyses de la biosynthèse de Pep5 et de l'épidermine (Fig. 1.8) au moins deux étapes intermédiaires sont effectuées lors du processus de modification (Bierbaum *et al.* 1996): d'abord la formation de résidus didéhydro (dhA, didéhydroalanine et dhB, didéhydrobutyrine) suivie par la formation de ponts thioéthers (ex. Lan, lanthionine et MeLan,  $\beta$ -méthyllanthionine) et d'autres résidus non-usuels (Fig. 1.6 et 1.7).

Les enzymes biosynthétiques impliquées dans le processus des modifications après traduction sont *lanB*, *lanC*, *lanM*, *lanD* et *lanO*. L'enzyme *LanB* (ex. L-sérine déshydratase) est impliquée dans la déshydratation des résidus Ser et Thr et *LanC* serait responsable de la formation de ponts thioéthers. Pour certains lantibiotiques, une seule enzyme, appelée *LanM*, serait responsable de ces deux réactions de modification (Jack et Sahl, 1995). C'est le cas pour la lactocine S (Gilmore *et al.* 1996), les cytolysines (Gilmore *et al.* 1996), la lacticine 481 (Nes et Tagg, 1996), la mutacine J-T8 (Woodruff *et al.* 1998), la streptococcine A-FF2 (McLaughlin *et al.* 1999) et la mersacidine *LanM* (Sahl et Bierbaum, 1998). La région C-

terminale des protéines LanM est caractérisée par une similarité de séquence avec LanC. Par contre, la région N-terminale ne semble pas être semblable à LanB. Cependant, l'hypothèse que la partie C-terminale de LanM soit responsable de la formation des ponts thioéthers et la partie N-terminale, des réactions de déshydratation a été émise (Sahl et Bierbaum, 1998).

Pour les lantibiotiques qui portent un résidu AviCys (épidermine et les mutacines B-Ny266 et B-JH1140) ou un résidu AviMeCys (mersacidine) en C-terminal, le résidu Cys est décarboxylé par l'enzyme LanD avant la formation du pont thioéther (Kupke et Götz, 1996). Le gène *eciO*, retrouvé chez la souche productrice de l'épicidine 280 (*S. epidermidis*), code pour une enzyme de la famille des oxydoréductases qui serait responsable de la réduction de l'oxopropionyle en N-terminal en 2-hydroxypropionyle (Heidrich *et al.* 1998).

#### 1.4.5.2. Clivage et sécrétion

Le peptide signal est retiré du pré-peptide (afin de libérer le peptide biologiquement actif) par des protéases après que les réactions de modification aient été complétées. Le processus protéolytique peut avoir lieu avant (Pep5), durant (lantibiotiques de la classe AII) ou après (nisine, épidermine) l'exportation du peptide (Bierbaum *et al.* 1996). Pour les lantibiotiques qui sont clivés après leur exportation, la présence du peptide signal maintient le lantibiotique sous une forme inactive (Sahl et Bierbaum, 1998).

Le clivage du peptide signal mène au lantibiotique actif (Sahl et Bierbaum, 1998). Les produits des gènes *lanP* et *lanT* sont impliqués respectivement dans le clivage protéolytique de la séquence signal et dans la sécrétion (transport) des lantibiotiques à l'extérieur de la cellule.

Le clivage du peptide signal pour les lantibiotiques de la classe AI et pour la lactocine S est effectué par des enzymes de la famille des sérine protéases (LanP). L'activation de ces peptides peut avoir lieu avant ou après leur exportation par le transporteur LanT. Ces protéines (LanT) sont membre de la famille des transporteurs ABC (ATP binding cassette).

Les lantibiotiques de la classe AII ainsi que la mersacidine (type B) semblent utiliser des protéases différentes de celles de la famille des sérine protéases. Les transporteurs (LanT) associés à des peptides possédant un site de clivage du type double-glycines (motif GG) ont un domaine protéase en N-terminal. Ils sont clivés et activés en même temps qu'ils sont exportés (Sahl et Bierbaum, 1998). La seule exception à cette règle est la cytolysine, car elle est clivée par un transporteur chimérique qui ne l'active pas. Après la sécrétion, le pré-cytolysine est clivé une deuxième fois par l'action d'une sérine protéase CylP (Sahl et Bierbaum, 1998).

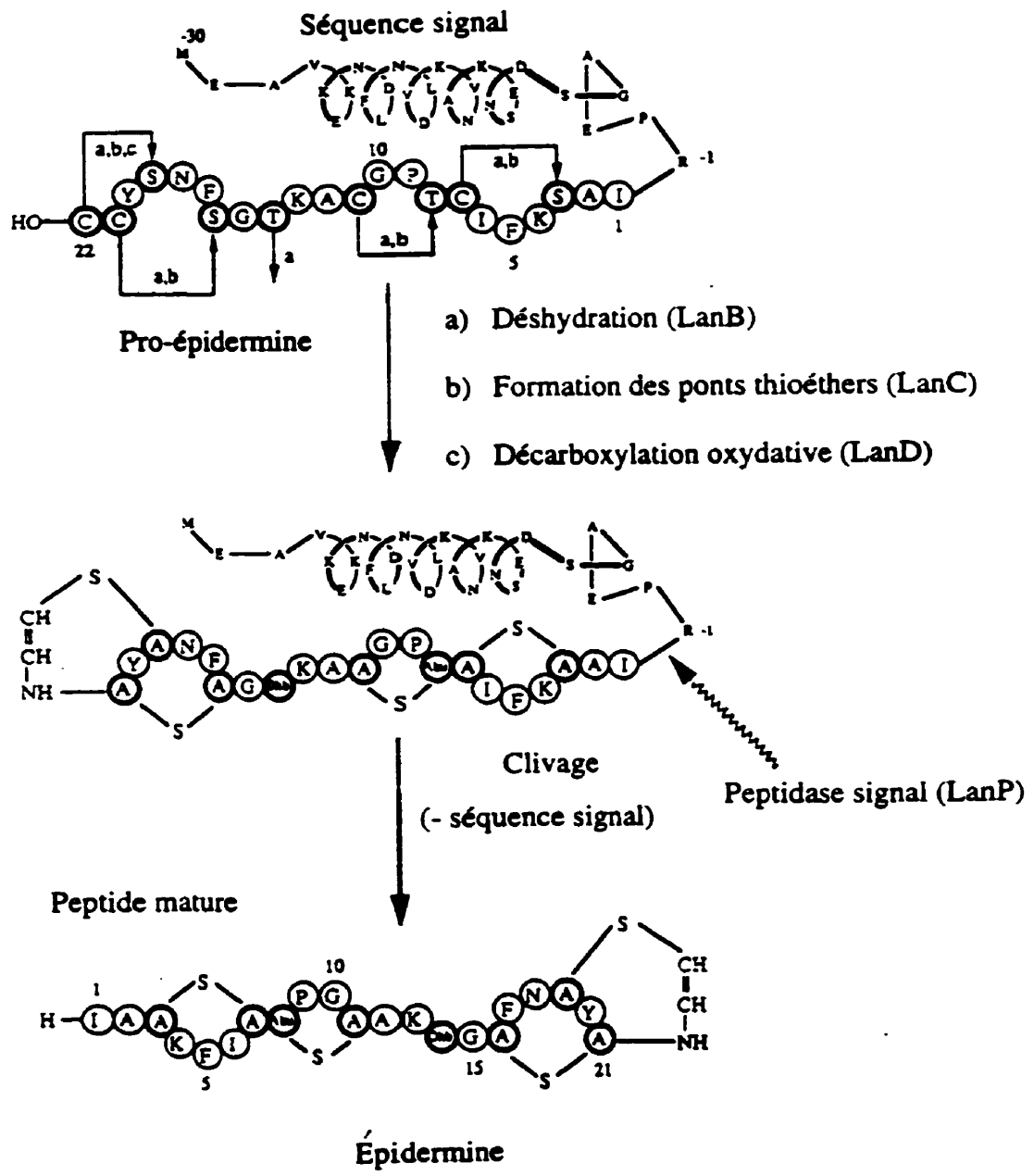
La localisation de la protéase peut être différente selon le lantibiotique. La NisP est une sérine protéase qui possède un peptide signal sécrété par la voie dépendante de *sec* en N-terminal et sa partie C-terminale est intégrée dans la membrane. Le fait que NisP soit une enzyme extracellulaire suggère que le clivage protéolytique est la dernière étape de la biosynthèse de la nisine (Jack et Sahl, 1995). Les protéines EpiP et CylP sont aussi des enzymes extracellulaires qui possèdent un peptide signal sécrété par la voie dépendante de *sec* en N-terminal. Cependant, la région C-terminale de ces protéines n'est pas intégrée dans la membrane. Dans le cas de la nisine et de l'épidermine par exemple, les lantibiotiques sont activés seulement après avoir été exportés par la protéine LanT (Sahl et Bierbaum, 1998). Les protéines PepP, ElkP et LasP seraient des enzymes intracellulaires, jugé par l'absence du peptide signal sécrété par la voie dépendante de *sec* et de la pro-séquence (Sahl et Bierbaum, 1998), ce qui suggère que le processus de clivage de la séquence signal se produit avant le transport du lantibiotique actif (Jack et Sahl, 1995).

La souche productrice de subtiline ne possède pas de gènes codant pour une protéase spécifique. Toutefois, *B. subtilis* est connu pour la sécrétion d'une variété de sérine protéases (ex. la subtilisine) qui pourraient être impliquées dans l'activation protéolytique de la subtiline (Siezen *et al.* 1996).

Les transporteurs LctT, CylT et MrsT contiennent une extension d'une centaine d'acides aminés en N-terminal dont deux motifs sont conservés. Des protéines similaires sont retrouvées pour les bactériocines qui ne sont pas des lantibiotiques comme par exemple la lactococcine G (classe IIb; Siezen *et al.* 1996).

**Figure 1.8. Schéma de la biosynthèse de l'épidermine: modifications du pré-peptide (LanA).**

Les acides aminés sont représentés par le code à une lettre. Les groupements Ser et Thr de la pré-épidermine (région pro-épidermine) sont déshydratés enzymatiquement pour former, avec les groupements thiols des cystéines, les ponts thioéthers lanthionine et  $\beta$ -méthyllanthionine. Le groupement thiol de la cystéine (Cys22) en C-terminal vient s'ajouter au résidu déshydraté (dhA19) qui est par la suite décarboxylé, pour former le résidu cyclique aminovinyle (AviCys) en C-terminal.



(adapté de Jung, 1991a)



### 1.4.5.3. Régulation de la biosynthèse

La synthèse des nombreux lantibiotiques survient au début de la phase stationnaire ou à la fin de la phase exponentielle de croissance bactérienne. Cette étape est contrôlée par des protéines de régulation. Les protéines LanR et LanK sont des homologues de la famille des systèmes de régulation à deux composantes (dans le cas de l'épidermine une seule protéine EpiQ; Siezen *et al.* 1996; Sahl et Bierbaum, 1998). Ces deux composantes sont l'histidine kinase (LanK) qui répond au signal extérieur par l'auto-phosphorylation spécifique du résidu His, suivi par le transfert du groupement phosphate à la protéine LanR, qui agit alors comme un activateur transcriptionnel en liant l'ADN (Jack et Sahl, 1995).

La production de certaines bactériocines semble dépendre d'un inoculum minimal de la souche productrice capable de produire assez de bactériocine pour induire la production. Saucier *et al.* (1995) ont démontré ce phénomène de régulation par l'addition de carnobactériocines produites par *Carnobacterium piscicola* LV17 directement dans le milieu. Ce phénomène d'induction a également été démontré pour la nisine (Sahl et Bierbaum, 1998). Il serait ainsi contrôlé par un système de régulation à deux composantes tel que décrit ci-haut.

### 1.4.5.4. Immunité des souches productrices

La production des lantibiotiques pourrait être potentiellement limitée car les cellules productrices sont souvent sensibles à l'action de leur peptide. Toutefois, la plupart des souches productrices ont un degré de résistance à leur peptide supérieur aux souches non productrices (Jack et Sahl, 1995). Cette protection des cellules productrices contre leur propre lantibiotique est due à des peptides ou à des protéines extracellulaires d'immunité (LanI).

Les protéines d'immunité NisI et SpaI sont des lipoprotéines qui sont ancrées à l'extérieur de la membrane cytoplasmique (Jack et Sahl, 1995). Les peptides d'immunité ont été retrouvés également parmi les gènes codant la Pep5, la lactocine S et l'épicidine 280. Il semble que ces lantibiotiques sont activés protéolytiquement à l'intérieure de la cellule (Sahl

et Bierbaum, 1998). Les peptides PepI, LctI et EciI ne sont pas des lipoprotéines. Ils possèdent un N-terminal hydrophobe et un C-terminal hydrophile. Ils sont également associés à l'extérieur de la membrane cytoplasmique. La surexpression de NisI confère un degré de résistance plus élevé à *L. lactis ssp. lactis* envers la nisine. La destruction de PepI anéantit l'immunité de *S. epidermidis* 5 envers la Pep5. Cependant, le mécanisme d'action de LanI n'est pas encore bien élucidé (de Vos *et al.* 1995).

Les protéines LanE, LanF et LanG sont également impliquées dans l'immunité des souches productrices envers les lantibiotiques (Sahl et Bierbaum, 1998; Siezen *et al.* 1996). Les gènes des opérons nisine, subtiline, épidermine et mersacidine possèdent aussi *lanEFG*, qui sont codés en deux (*spaF* et *spaG*) ou en trois sous-unités séparées (*nisFEG*, *epiFEG* et *mrsFGE*; Sahl et Bierbaum, 1998). Une diminution de la résistance à de la subtiline exogène a été observée lors de la perte de SpaFG. Ces transporteurs pourraient augmenter la résistance ou l'immunité à la subtiline par le transport de cette molécule à l'extérieur de la cellule (Jack et Sahl, 1995). La protéine LanF est un constituant intracellulaire d'un domaine liant l'ATP et LanG et LanE représentent la sous-unité traversant la membrane (Sahl et Bierbaum, 1998). Étant donné la similarité de séquence de protéines EpiFEG avec les transporteurs ABC, il semble que ces protéines sont aussi impliquées dans le transport des lantibiotiques vers l'extérieur de la membrane cytoplasmique. La concentration de lantibiotique serait donc conservée en dessous d'un niveau critique, ce qui empêcherait la formation des pores dans la membrane de la cellule productrice (Otto *et al.* 1998).

#### 1.4.5.5. Déterminants génétiques

Le clonage et le séquençage des gènes structuraux des pré-peptides ont été complétés pour plusieurs lantibiotiques (Tableau 1.2). Les gènes des lantibiotiques sont habituellement organisés en opéron. Les gènes codant les enzymes impliquées dans la biosynthèse des lantibiotiques sont souvent retrouvés sur le chromosome ou sur un plasmide (Sahl et Bierbaum, 1998; voir Tableau 1.2). Toutefois, pour la nisine, ces gènes sont localisés sur un transposon. Selon la nomenclature usuelle, tous les gènes de lantibiotiques sont dénotés par

« *lan* ». Le gène codant le pré-peptide est désigné par *lanA* et le produit de ce gène (précurseur) est désigné par LanA.

Seulement deux gènes impliqués dans la production des mutacines B-JH1140 et B-Ny266 ont été identifiés: *lanA* et *lanB* (Hillman *et al.* 1998; G. LaPointe, communication personnelle). Pour la mutacine J-T8, sept gènes ont été séquencés *mutAM* (Woodruff *et al.* 1998), *mutRTFEG* (Qi *et al.* 1999a). Pour plusieurs autres lantibiotiques, les gènes de la biosynthèse ainsi que les gènes codant pour l'immunité ont été isolés et séquencés (Siezen *et al.* 1996; Sahl et Bierbaum, 1998). Les gènes du pré-peptide (*epiA*) et des modifications enzymatiques (*epiBCD*) de l'épidermine sont localisés dans un opéron du plasmide pTü32 de 54-Kb de *S. epidermidis*. D'autre part, le gène des peptides gallidermine (*gdmA*) est situé sur le chromosome de la souche *S. gallinarum* Tü3928 (Ottenwälder *et al.* 1995).

L'organisation des gènes des opérons lantibiotiques (*lanA*, *lanB*, *lanC*, *lanD*, *lanE*, *lanF*, *lanG*, *lanI*, *lanH*, *lanK*, *lanM*, *lanO*, *lanP*, *lanR*, *lanT*) diffère selon les différents lantibiotiques et les différentes souches productrices (Siezen *et al.* 1996). Par exemple, pour la biosynthèse de la nisine, 11 gènes qui codent pour les enzymes impliquées dans les différentes étapes de la biosynthèse et de l'immunité ont été identifiés (Siezen *et al.* 1996). Le gène *lanD* a été identifié pour l'épidermine et la mersacidine, *lanH* seulement pour la gallidermine, et *lanO* seulement pour l'épicidine 280 et il n'y a pas de *lanM* pour la biosynthèse des lantibiotiques de la classe AI (groupe nisine). Cependant, les opérons codant la biosynthèse des lantibiotiques de la classe AII (motif GG) ainsi que la mersacidine ont seulement le gène qui code pour l'enzyme LanM (Sahl et Bierbaum, 1998).

Neuf gènes impliqués dans la biosynthèse de l'épidermine ont été identifiés sur le plasmide pTü32 de 54 Kb (Ottenwälder *et al.* 1995; Peschel et Götz, 1996). Le gène structural *epiA* code pour le précurseur peptidique de l'épidermine. Il a été le premier gène des lantibiotiques à être caractérisé (Bierbaum *et al.* 1996). Les gènes *epiBCD* codent pour les protéines impliquées dans les modifications après traduction (Peschel *et al.* 1997). Les gènes *epiF*, *epiE* et *epiG* codent pour les protéines impliquées dans l'immunité à l'épidermine (Peschel *et al.* 1996). Les protéines EpiF, EpiE et EpiG sont similaires aux composantes de la famille de

transporteurs ABC impliquées dans l'immunité à la subtiline et à la nisine (Bierbaum *et al.* 1996). Jusqu'à présent, le gène *epiK* n'a pas été identifié dans les unités transcriptionnelles de l'épidermine (Bierbaum *et al.* 1996). Le gène *epiP* code pour une protéase extracellulaire qui catalyse le clivage du précurseur peptidique de l'épidermine (Peschel *et al.* 1997). EpiQ (ou EpiR, Siezen *et al.* 1996) est un régulateur transcriptionnel qui active la transcription des opérons *epiABCD* et *epiFEG* (Peschel *et al.* 1997). La protéine EpiQ(R) ne contient pas de motif N-terminal impliqué dans la phosphorylation comme c'est le cas de NisR et SpaR. Elle ne sera donc pas activée par une protéine kinase (une protéine membranaire sensorielle). Le domaine C-terminal capable de lier l'ADN est néanmoins présent. L'extrémité 5' du gène homologue *epiT* a été identifié en amont de l'*epiA* (Schnell *et al.* 1992). Ce gène, qui a une orientation opposée à *epiA*, est interrompu par une délétion de 20 pb, il serait donc non fonctionnel (Peschel *et al.* 1997; Schnell *et al.* 1992). Les gènes homologues *gdmT* et *gdmH* ont été récemment identifiés comme étant impliqués dans la sécrétion de la gallidermine (Peschel *et al.* 1997).

**Tableau 1.2. Gènes impliqués dans la biosynthèse, la régulation et l'immunité des lantibiotiques.**

Lantibiotique	Acronyme	Organisme	Séquence Signal	Déterminants génétiques (localisation)	Précurseur (# a.a.) LanA	Modification (enzymes) Lan	Clivage (protéase) LanP	Régulation		Immunité	
								Lan	Lan	Lan	LanI
Nisine	Nis	<i>L. lactis</i>	FNLD	transposon	57	BC	(+)	RK	TFEG	(+)	
Subtiline	Spa	<i>B. subtilis</i>	FNLD	chromosome	56	BC	nd	RK	TFG	(+)	
Épidermine	Epi	<i>S. epidermidis</i>	FNLD	plasmide	52	BCD	(+)	R	TFEG	nd	
Mutacine B-Ny266	Lan	<i>S. mutans</i>	FNLD	chromosome	63	B	nd	nd	nd	nd	
Mutacine B-JH1140	Lan	<i>S. mutans</i>	FNLD	chromosome	63	B	nd	nd	nd	nd	
Mutacine B-III	Mut	<i>S. mutans</i>	FNLD	chromosome	63	BCD	(+)	R	T	nd	
Pep5	Pep	<i>S. epidermidis</i>	FNLD	plasmide	60	BC	(+)	nd	T	(+)	
Épicidine 280	Eci	<i>S. epidermidis</i>	FNLD	nd	56	BCO	(+)	nd	nd	(+)	
Épilancine K7	Elk	<i>S. epidermidis</i>	FNLD	chromosome	55	nd	(+)	nd	T	nd	
Lactocine S	Las	<i>L. sakei</i>		plasmide	68	M	(+)	nd	T	(+)	
Lacticine 481	Lct	<i>L. lactis</i>	GG	plasmide	51	M	nd	nd	T(P)	nd	
Salivaricine	Sal	<i>S. salivarius</i>	GG	nd	51	nd	nd	nd	nd	nd	
Streptococcine A-FF22	Scn	<i>S. pyogenes</i>	GG	chromosome	51	M	nd	RK	T(P)FEG	nd	
Mutacine J-T8	Mut	<i>S. mutans</i>	GG	chromosome	53	M	nd	R	TFEG	nd	
Variacine	Var	<i>M. varians</i>	GG	nd	47	nd	nd	nd	nd	nd	
Cytolysines L1/L2	Cyl	<i>E. faecalis</i>	GG	plasmide	68/63	M	(+)	nd	T(P)	nd	
Sublancine 168	Sun	<i>B. subtilis</i>	GG	chromosome	56	nd	nd	nd	T(P)	nd	
Mersacidine	Mrs	<i>Bacillus</i> sp.		nd	68	MD	nd	RK	T(P)FEG	nd	

(adapté de: Hillman *et al.* 1998; LaPointe, information personnelle; McLaughlin *et al.* 1999; Paik *et al.* 1998; Pridmore *et al.* 1996; Qi *et al.* 1999a,b; Sahl et Bierbaum, 1998; Siezen *et al.* 1996)

T(P), protéine translocateur ABC qui a un domaine additionnel cystéine protéase, comme pour les bactériocines (non-lantibiotiques) de la classe II de Klaenhammer (1993); (nd), non disponible; (# a.a.), nombre d'acides aminés; le gène *epi T* est interrompu et incomplet (EpiT', EpiT'");

Nomenclature dans les références originales (entre parenthèse): NisA (SpaN), SpaA (SpaS), SpaB (SpaD/E), SpaT (SpaY), EpiR (EpiQ), EpiT (EpiY), CylA1 (CylL), CylA2 (CylLs), CylP (CylA), CylT (CylB), LctA (LcnDR1), LctM (LcnDR2), LctT (LcnDR3).

### **1.4.6. ACTIVITÉ BIOLOGIQUE**

Parmi les lantibiotiques, on retrouve: (i) des peptides qui agissent au niveau de la membrane cytoplasmique, en formant des pores et en altérant le potentiel transmembranaire, comme c'est le cas des lantibiotiques de type A (nisine, gallidermine, épidermine et Pep5) (Jung, 1991a,b); (ii) de peptides inhibiteurs de phospholipase A<sub>2</sub> (duramycines et cinnamycine) (Jung, 1991a,b); (iii) et des peptides inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane (actagardine et mersacidine) (Brötz *et al.* 1995; Zimmermann et Jung, 1997). Les lantibiotiques de type A tuent les cellules cibles immédiatement après leur addition tandis que les peptides qui inhibent la biosynthèse de la paroi cellulaire (mersacidine) provoquent généralement une lyse lente. La mort des cellules cibles n'arrive pas avant au moins un cycle complet de division de la cellule cible (Sahl et Bierbaum, 1998).

#### **1.4.6.1. Activité biologique de lantibiotiques de type A**

Plusieurs études du mécanisme d'action des lantibiotiques de type A (ex. nisine, subtiline, Pep5, épidermine et gallidermine) indiquent que la membrane cytoplasmique des cellules cibles est le premier site d'action de ces molécules (Sahl, 1991). Ces peptides tuent les bactéries cibles par l'éclatement de la membrane cytoplasmique. Ils déséquilibrent la couche de phospholipides et forment des pores dans la membrane cytoplasmique. Ceci entraîne l'écoulement rapide des molécules de petite taille (acides aminés, ATP) et d'ions inorganiques (potassium) à l'extérieur de la cellule, ainsi que la disparition du potentiel membranaire (Sahl et Bierbaum, 1998). La différence dans la composition membranaire des bactéries pourrait expliquer la différence de sensibilité aux lantibiotiques entre les cellules cibles. L'activation des enzymes autolytiques et l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane (mode d'action secondaire) ont été observés pour la nisine et la Pep5 (Sahl et Bierbaum, 1998).

L'interaction initiale entre le lantibiotique et la membrane cible se fait par des forces électrostatiques entre le peptide cationique et les lipides anioniques (groupements anioniques de la tête des phospholipides) de la membrane cytoplasmique (Breukink *et al.* 1997) ce qui

perturbe la dynamique des lipides (ex. fluidité de la membrane). Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer la façon dont les antibiotiques cationiques s'insèrent dans la couche lipidique et les types de structures qu'ils forment avec la partie hydrophobe de la membrane afin de permettre l'écoulement des solutés cytoplasmiques (van Kraaij *et al.* 1998).

Sahl (1991) a proposé que la formation des pores par les antibiotiques se fait selon le modèle d'insertion ou « barrel-stave » en utilisant la nisine comme modèle. Tout d'abord, les peptides sont liés à la surface de la membrane. Par la suite, il y a formation de pré-agrégats. En présence du potentiel électrique, ils pivotent et s'orientent perpendiculairement à la membrane pour former des pores à travers celle-ci (Benz *et al.* 1991; Moll *et al.* 1996; Sahl, 1991).

Le modèle « wedge » (Driessen *et al.* 1995) ou « wormhole » (modèle semblable utilisé pour la magainine) propose que les molécules amphiphiles adhèrent initialement à la surface de la membrane (Fig. 1.9). Le côté hydrophobe du peptide s'insère dans le feuillet externe de la bicouche lipidique (Moll *et al.* 1996; Sahl et Bierbaum, 1998). Par la suite, en présence d'un potentiel électrique trans-membranaire élevé, la molécule s'introduit dans la membrane. L'insertion du peptide, qui est toujours lié à la surface de la membrane, entraîne en même temps l'insertion des phospholipides (Driessen *et al.* 1995; Moll *et al.* 1996). La co-insertion du peptide lié à la surface de la membrane et des phospholipides anioniques résulte en une courbure des lipides de surface pour former des pores non-spécifiques (Driessen *et al.* 1995; Moll *et al.* 1996).

Le groupe de van Kraaij (1998) a proposé que l'insertion de la nisine dans la membrane se fait en trois étapes: (1) interaction initiale de la nisine avec la membrane cytoplasmique (Breukink *et al.* 1997). La partie C-terminale de la molécule interagit avec les charges négatives de la surface de la membrane (Sahl et Bierbaum, 1998); (2) insertion de la nisine dans la membrane. La partie N-terminale (résidus 1-19) serait responsable pour l'insertion de la nisine dans la membrane (Breukink *et al.* 1997; van Kraaij *et al.* 1998); (3) translocation de la partie C-terminale à travers la membrane (Fig. 1.9).

**Figure 1.9. Modèles proposés pour la formation des pores dans les membranes cytoplasmiques par les lantibiotiques cationiques de type A, lorsqu'ils sont en solution.**

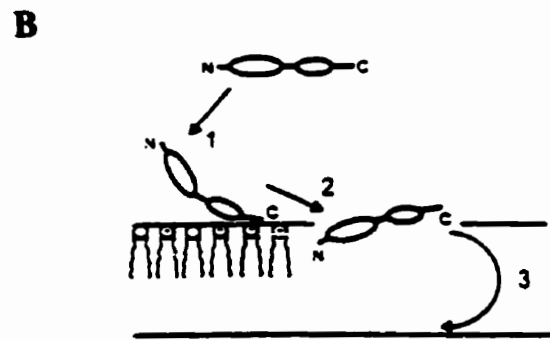
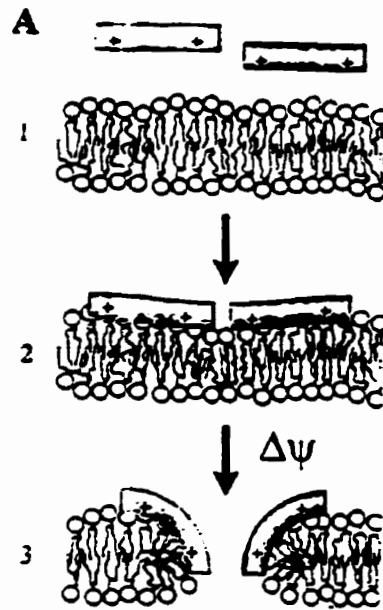
(A) modèle « wedge » de l'insertion de la nisine:

- (1) liaison du peptide cationique à la surface anionique des membranes (forces électrostatiques),
- (2) concentration locale élevée des peptides et perturbation de la dynamique des lipides,
- (3) en présence d'un potentiel membranaire au-dessus du seuil, les molécules s'insèrent dans la membrane. L'insertion des peptides liés à la surface entraîne en même temps les phospholipides avec eux produisant des pores non-spécifiques dans la membrane.

(B) modèle de l'insertion de la nisine avec une translocation:

- (1) liaison du peptide cationique (partie C-terminale) à la surface anionique des membranes (forces électrostatiques),
- (2) insertion du peptide dans la membrane. La partie N-terminale de la nisine pénètre dans la double couche de la membrane,
- (3) translocation de la partie C-terminale de la nisine à travers la membrane en provoquant des pores.





(adapté de: Driessen *et al.* 1995; Moll *et al.* 1996; Sahl et Bierbaum 1998; van Kraaij *et al.* 1998)

L'activité de la nisine varie selon le type de phospholipide membranaire (Breukink *et al.* 1998; Demel *et al.* 1996; Driessen *et al.* 1995; Gao *et al.* 1991; Kordel *et al.* 1989). L'association de la nisine avec les lipides chargés négativement, surtout le phosphatidylglycérol (PG), serait essentiel pour la fixation et l'insertion de la nisine dans la membrane. De plus, la présence de PG dans la membrane pourrait avoir une action directe avec la formation des pores (Breukink *et al.* 1998).

Les pores sont, généralement, non-sélectifs (membranes physiologiques ou artificielles). Cependant, Breukink *et al.* (1997) ont suggéré que la nisine Z forme des pores sélectifs anioniques. Les pores sont formés par plusieurs molécules de lantibiotique et ils ont besoin d'une énergie de formation (potentiel membranaire). Le diamètre des canaux formés par la nisine et Pep5 est d'environ 1 nm, tandis que ceux qui sont formés par la subtiline sont de 2 nm (Benz *et al.* 1991). Le temps de formation des canaux est fonction du courant-voltage (différence de potentiel de la membrane) et de l'énergie nécessaire pour l'insertion des peptides cationiques dans la membrane. Par exemple, la gallidermine et l'épidermine ont besoin d'un potentiel membranaire de 50-60 mV inférieur à celui de la nisine, de la Pep5 ou de la subtiline. Ceci suggère que les canaux formés par ces deux substances sont plus stables que ceux formés par les autres lantibiotiques testés. Le temps de vie des pores est de 30 s pour la gallidermine, tandis que pour les autres lantibiotiques il est de l'ordre de quelques minutes. Cependant, même si l'épidermine ne diffère de la gallidermine que par un acide aminé, le temps de vie des canaux formés par l'épidermine est inférieur à celui de la gallidermine. Ce fait est en accord avec l'observation que l'activité bactéricide de la gallidermine, est supérieure à celle l'épidermine (Kellner *et al.* 1988).

#### **1.4.6.2. Activité biologique de lantibiotiques de type B**

Les lantibiotiques de type B, sous-classe cinnamycine (cinnamycine, duramycines et ancovenine) peuvent avoir une activité antimicrobienne et une activité dans des systèmes biologiques. Ils affectent la croissance de *Bacillus* sp.: il y a augmentation de la perméabilité membranaire, effets sur différentes fonctions membranaires, ainsi que la formation de pores dans les membranes artificielles qui contiennent de la phosphatidyléthanolamine. Cependant,

contrairement aux lantibiotiques de type A, aucun écoulement des solutés n'a été observé chez les cellules de staphylocoque traitées avec la cinnamycine (Sahl et Bierbaum, 1998), ce qui indique que la formation de ces pores n'aurait pas un rôle bactéricide important.

Les lantibiotiques du groupe cinnamycine agissent également comme inhibiteur de la phospholipase A<sub>2</sub> (Fredenhagen *et al.* 1991). Cet enzyme est impliquée dans la biosynthèse des prostaglandines et des leucotriènes qui sont des composants importants du système immunitaire. Ils interagissent de façon spécifique avec la phosphatidyléthanolamine (phospholipide de la membrane cytoplasmique), en bloquant l'accès de l'enzyme au substrat ou en perturbant l'organisation de la membrane cellulaire.

Le mécanisme d'action de la mersacidine et de l'actagardine (Zimmerman *et al.* 1995) sur la biosynthèse de la paroi cellulaire n'est pas encore bien élucidés. Il semble que ces substances inhibent la biosynthèse du peptidoglycane chez les bactéries à Gram positif. Contrairement à l'antibiotique pénicilline qui agit en inhibant la muréine glycopeptide-transpeptidase, l'actagardine inhibe probablement le glycopeptide-transglycosylase. Cependant, l'inhibition de la transglycosylase est différente de celle effectuée par l'antibiotique vancomycine. La vancomycine agit en se liant à l'extrémité C-terminale du tri-peptide muramyl (L-Lys-D-Ala-D-Ala). Par contre, contrairement à la vancomycine, Brötz *et al.* (1995) ont démontré que l'activité de l'actagardine et de la mersacidine n'est pas affectée par ce tri-peptide.

#### **1.4.7. RÉSISTANCE AUX BACTÉRIOCINES**

##### **1.4.7.1. Résistance naturelle aux bactériocines des bactéries à Gram négatif**

Généralement, les bactéries à Gram négatif ne sont pas sensibles aux bactériocines produites par des bactéries à Gram positif, probablement à cause de la membrane externe qui agit comme une barrière imperméable empêchant la pénétration des bactériocines dont le site d'action primaire est au niveau de la membrane cytoplasmique. Cependant, les bactéries à Gram négatif deviennent sensible à la nisine (Stevens *et al.* 1991) lorsque que la membrane externe est modifiée. Kordel et Sahl (1986) ont démontré que les cellules d'*Escherichia coli*

deviennent sensibles à la nisine et à la Pep5 suite à l'altération de la membrane externe des bactéries par l'application d'un choc. La suppression du LPS (lipopolysaccharide, connu également sous le nom d'endotoxine) peut se faire par la voie de mutation génétique (Stevens *et al.* 1992) ou par le traitement chimique avec des agents chélateurs comme l'EDTA. L'éthylènediamine-tétraacétate affaiblit les interactions LPS-LPS en fixant les ions  $Mg^{+2}$  et d'autres cations divalents provoquant l'éclatement de la membrane externe. Stevens *et al.* (1992) ont testé l'action de la nisine contre des souches de *Salmonella typhimurium* qui ont subi une mutation au niveau du LPS. Le LPS est formé d'une région lipidique (lipide A) et d'une région constituée de polysaccharide. Le polysaccharide du LPS est formé d'une partie centrale, le core et d'une chaîne latérale appelée polysaccharide O. Les mutants testés ne contiennent plus de polysaccharide O et la portion manquante du core est différente selon le mutant. Les souches mutantes qui ont une faible suppression du core oligosaccharide du LPS demeurent résistantes à la nisine. Toutefois, les souches pour lesquelles la suppression du core oligosaccharide est prononcée démontrent une sensibilité à la nisine. Il semblerait donc que le core oligosaccharide du LPS ait un rôle à jouer dans la sensibilité à la nisine. Des résultats semblables à ceux de la nisine, en utilisant les mêmes souches mutantes, ont été obtenus par Mota-Meira (données non publiées) pour la mutacine B-Ny266.

#### **1.4.7.2. Résistance aux bactériocines des bactéries à Gram positif**

La résistance de souches bactériennes aux bactériocines varie selon la souche et la bactériocine testée. La plupart des études menées sur la résistance des bactéries à Gram positif aux bactériocines, particulièrement celles de la classe I (lantibiotiques), ont été réalisées en utilisant la nisine comme modèle. La résistance naturelle de certaines souches bactériennes à Gram positif (ex. *B. cereus*) est reliée à la présence de nisinase. Cette enzyme a été identifiée comme étant la déhydroalanine réductase et peut dégrader la nisine (Jarvis et Farr, 1971). Dans d'autres cas, la résistance est plutôt développée par les bactéries en présence des antimicrobiens. Les souches bactériennes qui autrefois étaient sensibles aux bactériocines deviennent résistantes. Elles sont appelées alors de bactéries mutantes résistantes aux bactériocines.

Le développement de la résistance bactérienne aux bactériocines est un mécanisme complexe qui n'a pas encore été bien établi. Les lantibiotiques de type A (ex. nisine) ont un mode d'action primaire sur la membrane cytoplasmique des cellules sensibles. Les modifications de la composition de la membrane cytoplasmique ont souvent été invoquées pour tenter d'expliquer l'augmentation de la résistance chez les mutants résistant aux bactériocines. Cependant, la résistance pourrait se faire à différents niveaux de l'enveloppe cellulaire, tant au niveau de la membrane cytoplasmique, qu'au niveau de la paroi cellulaire ou des éléments externes à la paroi (ex. acides teichoïques, polysaccharides, glycocalyx). Le mode d'action inclurait la liaison du lantibiotique à la cellule bactérienne, l'insertion de la molécule à travers la membrane et la formation de pores (Garcerá *et al.* 1993; Sahl, 1991; Winkowski *et al.* 1994). La résistance pourrait donc provenir de modifications de la composition de la membrane cytoplasmique en acides gras (Crandall et Montville, 1998; Mazzotta et Montville, 1997; Ming et Daeschel, 1993) et en phospholipides (Crandall et Montville, 1998; Ming et Daeschel, 1995), d'altérations de la paroi cellulaire (Crandall et Montville, 1998; Davies *et al.* 1996; Maisnier-Patin et Richard, 1996) et de changements dans la demande de cations divalents (Crandall et Montville, 1998).

Jusqu'à présent, plusieurs mutants résistant à la nisine (Nis<sup>r</sup>) ont été facilement isolés, en laboratoire, suite à l'exposition des souches bactériennes à des concentrations élevées de nisine. La majorité de mutants résistant isolés proviennent des souches de *Listeria monocytogenes* (Davies et Adams, 1994; Harris *et al.* 1991; Mazzotta et Montville, 1997; Ming et Daeschel, 1993; Schillinger *et al.* 1998; Verheul *et al.* 1997), de *Listeria innocua* (Maisnier-Patin et Richard, 1996), de *Clostridium botulinum* (Mazzotta *et al.* 1997), de *Pediococcus acidilactici* (Goulhen *et al.* 1998) et de *Streptococcus pneumoniae* (Severina *et al.* 1998).

Des modifications de la composition de la membrane cytoplasmique ont été observées chez plusieurs mutants résistant à la nisine. Des modifications de la composition en acides gras ont été démontrés pour différents mutants Nis<sup>r</sup>. Comparativement à la souche-mère, les mutants de *L. monocytogenes* Nis<sup>r</sup> présentaient plus d'acide gras à chaîne linéaire qu'à chaîne ramifiée (Ming et Daeschel 1993), plus d'acides gras à longue chaîne qu'à courte chaîne

(Crandall et Montville, 1998) ainsi qu'une diminution du ratio  $C_{15}/C_{17}$  (Mazzotta et Montville, 1997). Une diminution de la fluidité et une augmentation de la rigidité membranaire ont été observées pour les mutants de *L. monocytogenes* Nis<sup>r</sup>. Ce fait pourrait empêcher l'insertion de la nisine dans la membrane cytoplasmique. Les mutants de *Clostridium botulinum* Nis<sup>r</sup> présentaient aussi une diminution d'acides gras insaturés et une augmentation de la rigidité membranaire (Mazzotta et Montville, 1999). Cependant, Verheul *et al.* (1997) n'ont pas observé de différence significative entre la composition en acides gras membranaires d'un mutant de *L. monocytogenes* Nis<sup>r</sup> et celle de la souche-mère.

Des modifications en phospholipides membranaires ont également été mises en évidence chez plusieurs mutants résistant à la nisine. Les mutants de *L. monocytogenes* Nis<sup>r</sup> contenaient plus de phospholipides sous forme de zwitterion (PE, phosphatidyléthanolamine) et moins de phospholipides sous forme anionique (PG, phosphatidylglycérol et cardiolipine) que la souche-mère (Crandall et Montville, 1998; Ming et Daeschel 1995). Contrairement à ces études, Davies *et al.* (1996) n'ont pas trouvé de différence significative entre les phospholipides membranaires de la souche-mère et ceux d'un mutant de *L. monocytogenes* Nis<sup>r</sup>. Verheul *et al.* (1997) ont déterminé que des mutants de *L. monocytogenes* Nis<sup>r</sup> produisaient plus de phosphatidylglycérol (PG) et moins de diphosphatidylglycérol (DPG) que la souche-mère. Il semblerait que la nisine pénètre plus profondément dans la mono couche de DPG que dans d'autres lipides incluant le PG. Étant donné le rôle des phospholipides anioniques dans l'interaction de la nisine avec les membranes, une diminution de la charge nette négative de la couche lipidique peut empêcher l'interaction initiale entre le lantibiotique et la membrane.

Des changements au niveau de la paroi cellulaire pour différentes souches devenues résistantes à la nisine ont été observés. Par rapport à la souche-mère, les mutants Nis<sup>r</sup> présentaient une variation de la sensibilité aux antibiotiques (ex. ampicilline, benzylpenicilline et vancomycine) et aux enzymes (ex. lysozyme) qui agissent sur la paroi cellulaire soit pour *L. monocytogenes* Nis<sup>r</sup> (Crandall et Montville, 1998), pour *Listeria innocua* Nis<sup>r</sup> (Maisnier-Patin et Richard, 1996) ou pour *Pediococcus acidilactici* Nis<sup>r</sup> (Goulhen *et al.* 1998). Ces changements de sensibilité peuvent être liés aux changements de la composition de la parois

cellulaire. De plus, les mutants de *L. monocytogenes* Nis<sup>r</sup> (Davies *et al.* 1996) et de *L. innocua* Nis<sup>r</sup> (Maisnier-Patin et Richard, 1996) sont devenus moins hydrophobes que la souche-mère. Le retrait de la paroi cellulaire d'un mutant de *L. monocytogenes* Nis<sup>r</sup> a provoqué la perte de résistance à la nisine chez le mutant (Davies et Adams, 1994). Cependant, la nature exacte des changements au niveau de la paroi cellulaire n'a pas encore été déterminée.

Il semblerait que les mutants *L. monocytogenes* Nis<sup>r</sup> aient besoin de cations divalents pour résister à l'effet de la nisine (Crandall et Montville, 1998). Abee *et al.* (1994) ont suggéré que les cations di- ou trivalents pourraient inhiber les interactions électrostatiques entre les charges positives de la nisine et les charges négatives de la tête des phospholipides. La neutralisation des charges phospholipidiques peut provoquer une condensation des phospholipides et une rigidité membranaire plus élevée. Des cations divalents seraient encore nécessaires pour stabiliser les modifications membranaires de mutants Nis<sup>r</sup> leur permettant ainsi de résister à l'action de la nisine. De plus, ces cations divalents pourraient jouer un rôle dans les modifications de la paroi cellulaire des mutants Nis<sup>r</sup>. Ils interagissent avec les composants de la paroi cellulaire, spécialement les acides teichoïques (chargés négativement). Les changements dans la paroi cellulaire des mutants Nis<sup>r</sup> requièrent une quantité additionnelle de cations divalents pour stabiliser les charges négatives supplémentaires ou encore pour prévenir la liaison de la nisine avec les sites anioniques (Crandall et Montville, 1998).

L'apparition de mutants stables résistant à la nisine de la souche de *S. pneumoniae* multi-résistante aux antibiotiques est survenu rapidement suite à l'exposition répétitive de la souche de pneumocoque aux concentrations élevées de nisine (Severina *et al.* 1998). Toutefois, le mécanisme de résistance des pneumocoques n'est encore pas connu.

Les travaux effectués par Dagry (1996) afin d'obtenir des mutants de *Micrococcus luteus* résistant à la mutacine B-Ny266 ont démontré que *M. luteus* a développé uniquement une adaptation physiologique (très instable) à cette substance. Cette adaptation physiologique serait probablement due à une production de polysaccharides extracellulaires. Cette hypothèse a été émise suite à la diminution d'activité de la mutacine B-Ny266 en présence de polysaccharides exogènes et à l'apparance muqueuse des colonies des cultures résistantes.

### 1.4.7.3. Résistance croisée

Les mutants résistant à une bactériocine peuvent ou non être résistant à d'autres bactériocines. Plusieurs mutants spontanés de *L. monocytogenes* résistant à la plantaricine C19, à la mesentérocine 52 et à la curvaticine 13 ont été sélectionnés par Rekhif *et al.* (1994). Les mutants résistant à une de trois bactériocines démontrent une résistance croisée avec les autres deux bactériocines. Par contre, tous les mutants résistant sélectionnés ainsi que la souche-mère demeurent sensibles à la nisine. D'autre part, les travaux réalisés par Mazzotta *et al.* (1997) ont démontré que les mutants spontanés de *C. botulinum* Nis<sup>f</sup> devenaient aussi résistants (à différents degrés) à d'autres bactériocines (pédiocine PA-1, bavaricine MN, plantaricine BN, et leuconocine S). Les mutants de *L. monocytogenes* résistant à la piscicoline 126 sont aussi devenus résistants à la pédiocine PO2 (Wan *et al.* 1997). Dans le même sens, les mutants de *L. monocytogenes* Nis<sup>f</sup> sont devenus résistants à la pédiocine PA-1 et à la leuconocine S (bactériocines de la classe IIa et IV, respectivement; Crandall et Montville, 1998). Cependant, les résultats du test d'activité effectué par Mota-Meira *et al.* (1999; Chap. IV, Tableau 4.13) ont démontré que le mutant de *L. monocytogenes* Nis<sup>f</sup> (Crandall *et al.* 1998) n'a pas développé une résistance croisée à la mutacine B-Ny266. Néanmoins, une légère diminution de la sensibilité (selon le mutant) à la mutacine B-Ny266 a été observée pour les mutants de *Pediococcus acidilactici* Nis<sup>f</sup> (Goulhen *et al.* 1998). Les travaux de Schillinger *et al.* (1998) ont démontré une absence de résistance croisée pour les mutants spontanés de *L. monocytogenes* Nis<sup>f</sup> qui sont toujours sensibles à la sakacine A et à l'entéroïcine B.



#### 1.4.8. APPLICATIONS

Les lantibiotiques sont actifs contre les bactéries à Gram positif. L'activité est variable selon le lantibiotique et la souche sensible utilisée. Toutefois, lorsque la membrane externe des bactéries à Gram négatif est endommagée (traitement thermique, abaissement du pH, ajout d'un agent chélateur ou d'un détergent) ces bactéries deviennent sensibles aux lantibiotiques (Sahl *et al.* 1995; Stevens *et al.* 1991). Le potentiel d'application des lantibiotiques est donc très grand, principalement dans les domaines médicaux et alimentaires. La nisine cependant le seul lantibiotique à être commercialisé. Elle est utilisée pour prévenir la détérioration des aliments et les toxi-infections alimentaires provoquées par les bactéries à Gram positif (*Clostridium* sp., staphylocoques, bacilles et *L. monocytogenes*; Molitor et Sahl, 1991). Toutefois, les études sur l'application de la nisine en clinique sont de plus en plus nombreuses, principalement contre *Helicobacter pylori* et les entérocoques résistants à la vancomycine, et comme désinfectant pour prévenir la mammite bovine causée par les staphylocoques (Sahl *et al.* 1995). La gallidermine et l'épidermine pourraient être utilisées comme agent thérapeutique contre *P. acnes* dans les formulations topiques pour l'acné (Jung, 1991b). Chikindas *et al.* (1997) ont suggéré l'utilisation des mutacines actives contre *S. mutans* pour combattre la carie. La mersacidine (lantibiotique de type B) a démontré une bonne activité *in vivo* chez la souris contre des souches de *S. aureus* résistantes à la méthiciline ou « MRSA » (methicilin resistant *Staphylococcus aureus*; Limbert *et al.* 1991). La vancomycine et la teïcoplanine sont les antibiotiques actuellement utilisés pour le traitement des infections causées par les MRSA. Cependant, un faible degré de résistance est apparu lors du traitement à la vancomycine en 1997 aux États-Unis (Sahl et Bierbaum, 1998). Dans ce contexte, la mersacidine et l'actagardine (lantibiotiques avec un nouveau mode d'action) pourraient devenir une nouvelle classe d'antibiotiques (Sahl et Bierbaum, 1998). Les peptides (les duramycines) inhibiteur d'enzymes sont aussi immunologiquement intéressants. Le Tableau 1.3 résume quelques applications possibles pour les lantibiotiques. De plus, quelques exemples de brevets y sont rapportés pour les lantibiotiques.

**Tableau 1.3. Applications et quelques exemples de brevets revendiqués pour les lantibiotiques.**

Substance	Application/ revendication	Référence (No de brevet)
Bactériocines (a)	Prévention de la carie	Miyahara <i>et al.</i> 1987 (US4693888)
Bactériocines (b)	Composition de pâtes dentifrices	Doel et Smith, 1993 (WO 93/11738)
Nisine	Contre la mammite bovine, hygiène buccale, savon, produits de soin de la peau, contre l'acné	Harlander, 1993.
Nisine	Conservateur alimentaire, cosmétiques, agent sélectif de milieu de culture, agent thérapeutique	Ray, 1992 ; Molitor et Sahl 1991.
Nisine	Agent anti-plaque; composition de pâtes dentifrices	Gaffar <i>et al.</i> 1994 (US5368845)
Nisine	Agent antibotulinique dans le fromage et dans les aliments en général	Taylor <i>et al.</i> 1986a,b (US4584199 et US4597972)
Nisine Z	Séquence en acides aminés	deVos <i>et al.</i> 1997 (US5594103)
Mutant [E4]-subtiline	Augmentation de la stabilité du dhA5 et de l'activité sporicide de la subtiline	Hansen, 1996 (US5516682)
Épidermine	Agent thérapeutique contre les infections de bactéries à Gram positif, traitement de l'acné	Werner <i>et al.</i> 1990 (Can No 1.277.617)
Gallidermine	Traitement de l'acné, l'eczéma et la cellulite, dans les cosmétiques	Jung <i>et al.</i> 1993 (US5231013)
Lantibiotiques (c)	Traitement des sécrétions pulmonaires. Application topique par voie respiratoire (aérosol)	Molina <i>et al.</i> 1997 (US5651957)
Lantibiotiques (nisine)	Lantibiotiques combinés à des chélateurs (EDTA). Traitement d'infections gastro-intestinales	Blackburn <i>et al.</i> 1994 (US5304540)
Lantibiotiques (d)	Agent cosmétique désodorisant : (ajout d'un ou de plusieurs lantibiotiques)	Schmucker <i>et al.</i> 1994 (US5318778)
Lantibiotiques (e)	Contrôle de la contamination microbienne ( <i>L. monocytogenes</i> ) dans les dérivés de la viande	Collison <i>et al.</i> 1991 (US5015487)
Mersacidine	Préservatif alimentaire, traitement des infections par <i>S. aureus</i>	Koller <i>et al.</i> 1996 (EP0700998A1)

(a), de *E. coli*, staphylocoques, *S. mutans*; (b), ambicine N, gramicidine; (c), nisine, subtiline, épidermine, gallidermine, Pep5, duramycine, mersacidine, actagardine, cinnamycine et ancovenine; (d), nisine, épidermine, subtiline, Pep5, gallidermine, cinnamycine, duramycine et ancovenine; (e), nisine, subtiline, épidermine et Pep5.

Contrairement aux peptides antibiotiques qui sont synthétisés par un complexe multi-enzymatique, les lantibiotiques sont des peptides codés par des gènes pouvant être modifiés par mutagenèse dirigée. Par conséquent, plusieurs de leurs caractéristiques peuvent être améliorées ou optimisées (ex. production, action bactéricide, stabilité, solubilité et sensibilité aux protéases). Le génie génétique offre un grand potentiel dans le développement des lantibiotiques. Liu et Hansen (1992) ont démontré pour la première fois ce potentiel pour la subtiline (substance chimiquement instable par la perte du dhA5, probablement à cause du groupement carboxyl du Glu4 qui facilite l'addition nucléophile à la double liaison du dhA-5). Par le remplacement du résidu Glu-4 par Ile-4, la molécule a vu son effet sporicide triplé et la stabilité du résidu didéhydro en position 5 (dhA5) doublée.

Le très grand nombre de brevets sur l'application des lantibiotiques démontre le potentiel d'utilisation de ces peptides, soit dans l'industrie alimentaire ou dans l'industrie pharmaceutique. Les sujets des brevets déposés sont très variés. Ils peuvent cibler, par exemple, un seul peptide (ex. séquences) ou l'ensemble des peptides appartenant à une catégorie donnée (ex. lantibiotiques) pour une application définie (ex. formulation) ou non.

#### **1.4.8.1. Applications alimentaires**

Depuis quelques années, on remarque un accroissement de l'intérêt pour l'utilisation de métabolites microbiens actifs contre les bactéries pathogènes et celles qui détériorent les aliments. Parmi ces métabolites, les bactériocines, principalement celles produites par les bactéries lactiques font l'objet de nombreuses études.

Jusqu'à présent, la nisine est le seul lantibiotique utilisé comme bio conservateur alimentaire. Elle est sensible aux enzymes digestives ( $\alpha$ -chymotrypsine), non toxique et reconnue comme substance sécuritaire. Elle a été approuvée pour usage alimentaire dans une cinquantaine de pays incluant les États Unis et les pays européens (Delves-Broughton *et al.* 1996). Son application (type d'aliment et quantité permise) est réglementée selon la législation de chaque pays où son utilisation est permise. En Australie, par exemple, son utilisation a été autorisée dans les fromages et dans les aliments en conserve (ex. tomate et

soupes; Anonyme, 1991). Aux États Unis elle est autorisée uniquement dans le fromage à tartiner pour le contrôle de *Clostridium* sp. et au Canada, son utilisation n'est pas encore permise. Toutefois, son grand potentiel d'application actuelle est dans l'industrie laitière: contre *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* et contre les bactéries sporulantes (*Clostridium* sp.) présents dans les fromages (Delves-Broughton, 1996). Elle peut être utilisée aussi dans les aliments conservés en boîte contre les spores thermo-résistantes et acido-résistantes (*C. botulinum*, *Bacillus coagulans*, *B. stearothermophilus*), dans les boissons alcoolisées (contre les bactéries lactiques, ex. *Lactobacillus* sp. et *Pediococcus* sp.) et dans les sauces à salade (contre les bactéries lactiques; Delves-Broughton, 1996).

La nisine est commercialisée pour usage alimentaire par Aplin & Barrett Ltd. sous le nom de Nisapline® (25 mg nisine/g de Nisapline). Cette substance est préparée par la fermentation de *L. lactis* ssp. *lactis* dans du lait écrémé et standardisée avec le chlorure de sodium (Delves-Broughton *et al.* 1996; Anonyme, 1988). Son activité est exprimée en UI/g (Unité Internationale). Un microgramme (1 µg) de nisine pure équivaut à 40 UI (Ray, 1992).

Un aspect important pour l'application de la nisine est son activité biologique très étendue contre les bactéries à Gram positif (streptocoques, staphylocoques, bacilles, *Clostridium* et *Listeria*). Normalement, elle n'a pas d'effet contre les bactéries à Gram négatif, à l'exception de *Neisseria*, (Molitor et Sahl, 1991) ou lorsqu'il y a endommagement de la membrane externe. Par exemple, lorsque la nisine est combinée avec un agent chélateur (ex. EDTA) elle réduit la population de *Salmonella* sp. Le retrait des ions magnésium résulte en une perte de lipopolysaccharides de la membrane externe et une augmentation de la perméabilité cellulaire (Stevens *et al.* 1991). Cependant, l'efficacité bactéricide de la nisine est fonction du pH (plus active à pH acide), de sa solubilité (elle est pratiquement insoluble à pH alcalin) et de sa stabilité (stable aux pH acides; Molitor et Sahl, 1991). Son application est limitée, par exemple, aux aliments acides, liquides et avec une faible teneur en gras. Toutefois, une limitation principale à l'usage de la nisine comme conservateur alimentaire est l'apparition de souches mutantes (ex. *Listeria monocytogenes* et *Clostridium botulinum*, qui sont devenues résistantes à cet antimicrobien (voir section 1.4.7; Harris *et al.* 1992; Mazzotta *et al.* 1997; Ming et Daeschel, 1993).

### 1.4.8.2. Applications pharmaceutiques

Actuellement, les études sur l'application de la nisine en clinique sont de plus en plus nombreuses, principalement contre *Helicobacter pylori* et les entérocoques résistants à la vancomycine (VRE). Le tableau 1.4 fournit deux exemples de l'avancement du développement de la nisine comme agent thérapeutique.

**Tableau 1.4. Avancement des phases de développement pour l'utilisation de la nisine comme agent thérapeutique.**

Compagnie	Application clinique	Phases (1997)
Applied Microbiology, Astra et Merck	Infections gastriques et ulcères par <i>Helicobacter pylori</i>	Début de l'étape clinique (trois études cliniques)
Applied Microbiology et Nippon Shoji	Entérocoque résistant à la vancomycine	Recherche pré-clinique

(Adapté de Hancock, 1997)

L'utilisation de la nisine en présence d'un agent chélateur pour le traitement des ulcères et de l'inflammation chronique de l'estomac et du duodénum provoquée par *Helicobacter pylori* a été proposée et brevetée par Blackburn *et al.* (1994). Étant donné la sensibilité des streptocoques et des staphylocoques à la nisine, ce peptide offre la possibilité d'être utilisé pour le traitement des infections de la peau et des infections provoquées par les microorganismes multi-résistants aux antibiotiques (Delves-Broughton, 1996). La nisine pourrait être aussi utilisée dans les traitements de la mammite bovine provoquée par des souches des staphylocoques (*S. agalactiae* et *S. aureus*) et de streptocoques (*S. uberis*) (Delves-Broughton, 1996). L'utilisation de la nisine dans les rince-bouches pour empêcher l'augmentation de la plaque dentaire et les infections de la gencive a été proposée par Howell *et al.* (1993).

Applied Microbiology Inc. (AMBI) est responsable du développement et des tests cliniques de la nisine comme agent thérapeutique. Cette compagnie détient la majorité des brevets (une centaine de brevets) et des licences d'utilisation de la nisine et d'autres « lanthocines » (classe de peptides antimicrobiens dans le programme de développement pharmaceutique de l'AMBI) à travers le monde (rapport BW0342 « business wire's » de AMBI 1996). La compagnie AMBI a proposé l'application de la nisine pour le traitement des ulcères de l'estomac et des infections bactériennes du colon et ainsi que pour les infections acquises en milieu hospitalier (entérocoques résistantes à la vancomycine (VRE) et *C. difficile*). Le traitement des ulcères de l'estomac et des infections du colon serait effectué par voie orale (sous forme de pilules enrobées). Des études pré-cliniques ont démontré que la nisine ingérée est délivrée intacte dans le colon (rapports « business wire's » BW1210 et BW1161 de AMBI 1997). Ce fait implique que le peptide conserve ses effets bactéricides et qu'il ne se retrouve pas ailleurs dans le corps (pas d'effet co-latéral). Pour le traitement des ulcères de l'estomac, la nisine pourrait, cependant, être administrée par voie orale sans être enrobée car, elle est stable à pH acide et résistante à la pepsine (protéase de l'estomac). De plus elle est dégradée rapidement par les protéases pancréatiques (trypsine) et elle ne serait pas active aux pH élevés du petit intestin. Ces faits ont pour conséquence de réduire le potentiel des effets co-latéraux dans l'environnement gastro-intestinal (Delves-Broughton, 1996). La compagnie AMBI Inc. a développé encore une forme injectable de nisine pour le traitement des infections bactériennes dues aux souches résistantes aux antibiotiques (rapport BW1231 « business wire's » de AMBI 1997). Elle est actuellement à la recherche de partenaires pharmaceutiques européens et américains pour l'étape de commercialisation.

Le principal facteur limitant l'usage de la nisine en clinique est l'acquisition de la résistance à la nisine par des bactéries pathogènes, incluant multi-résistantes aux antibiotiques. Les travaux de Severina *et al.* (1998) ont démontré l'efficacité de la nisine contre des souches multi-résistantes aux antibiotiques (staphylocoques (MRSA), entérocoques (VRE) et *S. pneumoniae*). Cependant, l'apparition de mutants de *S. pneumoniae* résistants à la nisine est survenu rapidement suite à l'exposition répétitive (cinq passages) de pneumocoques aux concentrations élevées de nisine (voir section 1.4.7).

## 1.5. LES MUTACINES

### 1.5.1. HISTORIQUE ET DÉFINITION

Les mutacines sont des bactériocines produites par *Streptococcus mutans*. En 1969, Kelstrup et Gibbons furent les premiers à rapporter la production de bactériocines par certaines souches de *S. mutans*. Par la suite, le terme « mutacines » fût proposé par Hamada et Ooshima (1975) pour désigner des substances bactéricides de nature protéique produites par *Streptococcus mutans*.

### 1.5.2. CLASSIFICATION

Les méthodes de classification proposées à présent sont essentiellement basées sur l'activité des souches mutacinogènes contre des souches sensibles (Tagg et Bannister, 1979). Caufield *et al.* (1985) ont orienté la classification vers le patron d'immunité des souches mutacinogènes possédant un plasmide de 5,6 Kb (type I avec plasmide et type II sans plasmide). Bondi *et al.* (1991) ont testés en plus, la sensibilité des mutacines à la chaleur, au chloroforme et aux protéases; ce qui leur a permis de diviser les mutacines en cinq groupes. Par la suite, Morency *et al.* (1995) ont classé les mutacines en 24 groupes (A - X) grâce à une combinaison du spectre d'action des souches mutacinogènes (86 souches) contre elle-même et contre des souches sensibles types (12 souches). La mutacine Ny266 appartient au groupe B (B-Ny266), la mutacine Ny257 appartient au groupe S (S-Ny257), et la mutacine T8 au groupe J (J-T8). De même la mutacine JH1140 qui a été purifiée par Hillman *et al.* (1998) appartient au groupe B. Toutefois, cette classification est préliminaire et elle ne pourra être complète que lorsque les substances auront été caractérisées (purifiées et séquencées) ou par l'utilisation de sondes d'ADN construites à partir des séquences connues du pro-peptide.

### 1.5.3. CARACTÉRISTIQUES

Malgré que l'on ait rapporté la production d'un grand nombre de substances inhibitrices par *S. mutans*, seulement quelques unes ont été isolées, purifiées et caractérisées comme étant des bactériocines (Tableau 1.5). Parmi ces substances seulement les mutacines B-Ny266 (Chap. IV, Mota-Meira *et al.* 1997) et B-JH1140 (Hillman *et al.* 1998) ont été complètement séquencées. La mutacine J-T8 a été partiellement séquencée (huit premiers acides aminés) par Novak *et al.* (1994). De même, la séquence de quatre premiers acides aminés a été obtenu pour la mutacine B-III (Qi *et al.* 1999b). La séquence du gène codant pour le pré-peptide a été déterminée pour la mutacine J-T8 (Woodruff *et al.* 1998), pour la mutacine B-JH1140 (Hillman *et al.* 1998), pour la mutacine B-III (Qi *et al.* 1999b) et pour la mutacine B-Ny266 (G. LaPointe, communication personnelle; Fig. 1.2 et 1.4). L'opéron au complet a été séquencé pour la mutacine J-T8 (Qi *et al.* 1999a) et ) pour la mutacine B-III (Qi *et al.* 1999b). Étant donné que ces substances possèdent des lanthionines dans leur structure, elles font partie des bactériocines de classe I, soit les lantibiotiques (Klaenhammer, 1993).

Les mutacines ont généralement une faible masse moléculaire (1-20 kDa) sauf la mutacine RM-10 (973 kDa). Normalement, elles sont résistantes à la chaleur, aux protéases salivaires, mais sensibles à la pronase (sauf les mutalipocines), active sur une vaste étendue de pH à l'exception de la mutacine RM-10 (active aux pH supérieurs à 6). Elles sont normalement actives contre des streptocoques et elles sont inefficaces contre la majorité des bactéries à Gram négatif, à l'exception des mutacines des groupes A, B (B-Ny266 et B-JH1140), I, J et T (Chap. II: Mota-Meira *et al.* 1999 et Chap. III: Morency *et al.* 1999) qui sont actives contre des souches de *Neisseria* et les mutacines des groupes A, B, C et D actives contre *Helicobacter* et *Campylobacter*. Le tableau 1.5 résume les principales caractéristiques des mutacines isolées jusqu'à présent.



**Tableau 1.5. Principales caractéristiques des mutacines.**

<b>Mutacine (souche productrice) [référence]</b>	<b>Masse (kDa)</b>	<b>Spectre d'activité</b>	<b>Stabilité (température et pH)</b>	<b>Résistance aux enzymes</b>
<b>GS-5</b> <i>(S. mutans</i> GS-5) [Paul et Slade, 1975]	> 20,0	(S) certains streptocoques, <i>S. pyogenes</i> , <i>E. faecalis</i> (R) <i>S. cricetus</i> , <i>S. rattus</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. sobrinus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i>	(R) 100°C, 10 min (R) pH 2-7 (37°C, 45 min) (S) pH 11	(R) catalase (S) trypsine, pronase
<b>RM-10</b> <i>(S. mutans</i> Rm-10) [Fukushima <i>et al.</i> 1982; Fukushima <i>et al.</i> 1985]	973,0	(S) <i>S. mutans</i> , <i>S. aureus</i> , <i>A. viscosus</i> , <i>A. naeslundii</i> , <i>B. subtilis</i> (R) <i>S. salivarius</i>	(S) 100°C, 10 min (R) pH 6-11 (S) pH 2-5	(R) nucléases, pepsine, lysosyme, phospholipase (S) $\alpha$ -chymotrypsine, trypsine, pronase
<b>C3603</b> <i>(S. mutans</i> C3603) [Ikeda <i>et al.</i> 1982]	4,8	(S) <i>S. mutans</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S.</i> <i>bovis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L.</i> <i>casei</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. mesenteroides</i> , <i>B.</i> <i>bifidum</i> , <i>B. longum</i> , <i>P. acnes</i> (R) <i>C. parvum</i> , <i>Candida</i> sp.	(R) 100°C, 10 min (pH 2-7), (R) 121°C, 15 min (pH 4) (S) 121°C, 10 min (pH 7) (R) pH 1-12 (24h, 37°C)	(R) pronase, papaine, trypsine, phospholipase C, $\alpha$ - amylase ( $\pm$ S) $\alpha$ -chymotrypsine, pancréatine
<b>Mutacine JH1000</b> <i>(S. mutans</i> JH-1000) [Hillman <i>et al.</i> 1984]	< 1,0	(S) <i>S. mutans</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>A. israelii</i> , <i>A. naeslundii</i> , <i>A. viscosus</i> (R) <i>E. faecalis</i> , <i>L. casei</i> , <i>M. luteus</i>	nd	(R) DNase, RNase, lipases, thermolysine, lysozyme (S) trypsine, pronase

**Tableau 1.5. Principales caractéristiques des mutacines (suite)**

<b>Mutacine (souche productrice) [référence]</b>	<b>Masse (kDa)</b>	<b>Spectre d'activité</b>	<b>Stabilité (température et pH)</b>	<b>Résistance aux enzymes</b>
<b>Mutacine B-JH1140</b>  ( <i>S. mutans</i> JH1140) [Hillman <i>et al.</i> 1998; Morency <i>et al.</i> 1999 : Chap. II]	2,26	(S) Gram positif: toutes les souches testées incluant les multi- résistantes aux antibiotiques (chap. II); (S) Gram-négatif: <i>Neisseria</i> sp., <i>H. pylori</i> , <i>C. jejuni</i>	nd	nd
<b>Mutacine B-III</b>  ( <i>S. mutans</i> UA787) [Qi <i>et al.</i> 1999b]	2,27	(S) Gram positif: staphylocoque, entérocoque et <i>S.</i> <i>pneumoniae</i> (résistant aux antibiotiques), <i>S. sanguis</i>	nd	nd
<b>Mutacine B-Ny266</b>  ( <i>S. mutans</i> Ny266) [Parrot <i>et al.</i> 1990; Mota-Meira <i>et al.</i> 1997; Mota-Meira <i>et al.</i> 1999; Morency <i>et al.</i> 1999 : Chap. II, III et IV]	2,27	(S) Gram positif: toutes les souches testées incluant les multi- résistantes aux antibiotiques (chap. IV); (S) Gram-négatif: <i>Neisseria</i> sp., <i>H. pylori</i> , <i>C. jejuni</i>	(R) 100°C, 30 min	(R) carboxypeptidase A, catalase, lysozyme, pectinase, Rnase A, $\alpha$ -amylase, phospholipase C (S) $\alpha$ -chymotrypsine, papaïne, trypsine, pronase E, protéinase K

Tableau 1.5. Principales caractéristiques des mutacines (suite)

Mutacine (souche productrice) [référence]	Masse (kDa)	Spectre d'activité	Stabilité (température et pH)	Résistance aux enzymes
<b>Mutacine Ny257S</b>  ( <i>S. mutans</i> Ny257S) [Parrot <i>et al.</i> 1990]	12,0 - 14,0	(S) certains <i>S. rattus</i> , <i>S. sanguis</i> et <i>S. salivarius</i> , <i>L. lactis</i> , <i>E. faecium</i> (R) <i>S. mutans</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>C. sporogenes</i> , <i>Lactobacillus</i> sp., <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i>	(R) 80°C, 30 min (S) 100°C, 30 min	(R) carboxypeptidase A, catalase, lysozyme, pectinase, Rnase A, phospholipase C (S) $\alpha$ -chymotrypsine, papaine, trypsine, pronase E, $\alpha$ -amylase, protéinase K
<b>Mutacine J-T8</b>  ( <i>S. mutans</i> T8) [Parrot <i>et al.</i> 1990; Novack <i>et al.</i> 1992; Novack <i>et al.</i> 1994]	3,24	(S) <i>A. viscosus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. murinus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>M. luteus</i> , <i>S. cricetus</i> , <i>S. ferris</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S.</i> <i>sobrinus</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>C. sporogenes</i> , (R) <i>L. plantarum</i> , <i>L. monocytogenes</i>	(R) 121°C, 30 min	(R) carboxypeptidase A, catalase, lysozyme, pectinase, Rnase A, phospholipase C (S) $\alpha$ -chymotrypsine, papaine, trypsine, pronase E, protéinase K, $\alpha$ -amylase

**Tableau 1.5. Principales caractéristiques des mutacines (suite)**

<b>Mutacine (souche productrice) [référence]</b>	<b>Masse (kDa)</b>	<b>Spectre d'activité</b>	<b>Stabilité (température et pH)</b>	<b>Résistance aux enzymes</b>
<b>Mutacine C67-1</b> <i>(S. mutans</i> C67-1) [Parrot <i>et al.</i> 1990]	< 3,5	(S) <i>A. viscosus</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. sobrinus</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. mutans</i> , <i>L. lactis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Lactobacillus</i> sp., <i>L. monocytogenes</i> , <i>C. sporogenes</i> , <i>M. luteus</i>	(R) 121°C, 30 min	(R) carboxypeptidase A, catalase, lysozyme, pectinase, Rnase A, phospholipase C (S) $\alpha$ -chymotrypsine, papaine, trypsine, pronase E, $\alpha$ -amylase, protéinase K
<b>MT37913</b> <i>(S. sobrinus</i> MT3791) [Hamada <i>et al.</i> 1986]	nd	(S) <i>S. mutans</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>S. salivarius</i> , (R) <i>Staphylococcus</i> sp., <i>Actinomyces</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp.	(R) 100°C, 60 min (R) (4, -70)°C, 1 an (S) 120°C, 60 min (R) pH 3,8-7,6	(R) nucléases, catalase, protéases (S) papaine, pronase P
<b>MT6223</b> <i>(S. sobrinus</i> MT6223) [Loyola-Rodrigues <i>et al.</i> 1992]	6,5	(S) <i>S. mutans</i> , <i>S. milleri</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>S. salivarius</i> (R) <i>S. cricetus</i> , <i>S. rattus</i> , <i>S. sobrinus</i> , <i>Staphylococcus</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Actinomyces</i> sp.	(R) 100°C, 20 min (pH 5) (R) (4, -20, -70)°C, 3 sem. (S) 120°C, 20 min (R) pH 2-7 (S) pH 8-11	( $\pm$ S) protéase, $\alpha$ -chymotrypsine (S) ficine, papaine

**Tableau 1.5. Principales caractéristiques des mutacines (suite)**

<b>Mutacine (souche productrice) [référence]</b>	<b>Masse (kDa)</b>	<b>Spectre d'activité</b>	<b>Stabilité (température et pH)</b>	<b>Résistance aux enzymes</b>
<b>Mutacine b (<i>S. rattus</i> BHT) [Delisle, 1986; Delisle, 1975]</b>	3,5 à 6,0	(S) streptocoques bucaux, <i>S. pyogenes</i> , <i>E. faecalis</i>	(R) 100°C, 15 min (pH 3-7) (S) 100°C, 15 min (pH 11) (R) pH 3-11 (T°amb., 1 h)	(R) RNase, DNase, papaïne, lipase, lysozyme, ficine (S) α-chymotrypsine, trypsine
<b>Mutalipocines : ML-I et ML-II (<i>S. mutans</i> 32K) [Kurita et Hirasawa, 1988]</b>	0,5 et 1,0	(S) <i>S. mutans</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. sobrinus</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. bovis</i> (±S) <i>L. casei</i> , <i>A. viscosus</i> , <i>A. naeslundii</i> (R) <i>S. aureus</i>	(R) pH 3-10 (30°C, 1 h) (S) pH 2 (ML-I, ML-II) (S) pH 11 (ML-I)	(R) trypsine, pronase, phospholipase A (±S) lipase, phospholipase C

(R), résistant; (S), sensible; (±S), inactivation partielle; (nd), non déterminé. Toutes les mutacines sont inefficaces contre les bactéries à Gram négatif, sauf celles mentionnées dans ce tableau. *Actinomyces* sp. (*A. israelii*, *A. naeslundii*, *A. naeslundii* et *A. viscosus*), *Bacillus subtilis*; *Bifidobacterium* sp. (*B. bifidum* et *B. longum*), *Campylobacter jejuni*, *Clostridium sporogenes*, *Corynebacterium parvum*, *Enterococcus* sp. (*E. faecalis* et *E. faecium*), *Helicobacter pylori*, *Lactobacillus* sp. (*L. brevis*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. murinus* et *L. plantarum*), *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp. (*S. bovis*, *S. cricetus*, *S. ferris*, *S. milleri*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. pyogenes*, *S. rattus*, *S. salivarius*, *S. sanguis* et *S. sobrinus*), MRSA (staphylocoques résistant à la méthycilline, VER (entérocoques. Résistant à la vancomycine)

Contrairement aux autres mutacines, les deux mutalipocines (ML-I et ML-II), substances de faible masse moléculaire (1000 Da) produites par *S. mutans* 32K, sont de nature lipidique. Elles ont été partiellement inactivées par le traitement à la lipase et à la phospholipase C (Kurita et Hirasawa, 1988) et ne sont pas affectées par le traitement aux enzymes protéolytiques. Elles contiennent des groupements cétones ou aldéhydes. Elles sont solubles dans des solvants organiques et ont un spectre d'activité restreint à quelques streptocoques sur une vaste étendue de pH.

Les mutacines MT3791 et MT6223 produites par des souches de *S. sobrinus* (ancien *S. mutans* serotype g) devraient plutôt s'appeler « sobrinucines ». Ces substances ont un spectre d'activité limité à certains streptocoques buccaux et sont inefficaces contre les staphylocoques, les lactobacilles et les *Actinomyces*. Elles inhibent la synthèse des protéines, de l'ADN et de l'ARN (Hamada *et al.* 1986).

La mutacine b, produite par *S. rattus* BHT (ancien *S. mutans* serotype b, et qui devrait plutôt s'appeler « rattucine »), est une substance de faible masse moléculaire (< 6,0 kDa déterminée par filtration sur membrane), sensible à la trypsine et partiellement inactivée par la pepsine, la pronase et la subtilisine. La substance est active contre les streptocoques d'origine buccale ainsi que *S. pyogenes* et *E. faecalis* (Delisle, 1986). La souche productrice de mutacine b possède une « immunité limitée », sa croissance est inhibée par des concentrations élevées de mutacine. Ceci pourrait indiquer que l'élimination de *S. mutans* de la plaque serait possible par le traitement avec cette mutacine, même si la plaque contient des souches qui produisent de bactériocines homologues. Cette substance serait donc une bonne candidate pour lutter contre la carie (Chikindas *et al.* 1997).

La mutacine RM-10 possède une masse moléculaire très élevée (973 kDa). Cette protéine semble être acide (pI = 3,6). Elle contient des groupements phosphores et hexose, et est riche en acides aspartique et glutamique, glycine, alanine, leucine, et lysine. Elle est active contre *S. mutans*, *S. aureus* et *B. subtilis*, et inactive contre *S. salivarius*. La substance purifiée est inactivée par ébullition durant 10 minutes et par un pH inférieur à 6. *In vivo*, elle n'est pas affectée par la salive et le sucre. Cependant, elle est inactivée en présence de différents

ingrédients la diète animale, comme le lait écrémé et l'extrait de levure. Néanmoins, une réduction du nombre de bactéries présentes dans la salive a été observé après 20 minutes de rinçage avec cette bactériocine (Fukushima *et al.* 1985).

La mutacine C3603 a une faible masse moléculaire, est basique ( $pI = 10$ ), est active sur une vaste étendue de pH et possède un spectre d'activité contre plusieurs streptocoques et plusieurs autres bactéries à Gram positif (Ikeda *et al.* 1982). Elle inhibe la synthèse des protéines, de l'ADN et de l'ARN (Takada *et al.* 1984). *In vivo*, elle réduit l'incidence des caries chez les souris infectées ou non avec *S. mutans* serotype c, lorsque cette substance est ajoutée dans l'eau ou à la nourriture. Ooshima *et al.* (1985) ont obtenu aussi une réduction de la carie en utilisant un autre modèle animal et différentes souches de *S. mutans* serotype c. Toutefois, la mutacine C3603 est inactivée par certaines composantes de la diète animale comme des protéines et des hydrate de carbone non hydrolysés (Ikeda *et al.* 1982).

Parmi les mutacines partiellement caractérisées dans le laboratoire du Dr M. Lavoie soit C67-1, S-Ny257S, B-Ny266 et J-T8 (Parrot *et al.* 1990), la mutacine S-Ny257S diffère des autres par sa masse moléculaire plus élevée, sa résistance moindre à la chaleur et son spectre d'activité restreint à quelques streptocoques. Elle est inefficace contre les *Bacillus*, les *Listeria*, les staphylocoques, et les *S. mutans*.

La mutacine B-Ny266 possède le spectre d'activité le plus étendu parmi ces substances. Elle est active contre toutes les bactéries à Gram positif testées, même celles qui sont résistantes aux antibiotiques, et contre certaines bactéries à Gram négatif (Parrot *et al.* 1990; Chap. II: Mota-Meira *et al.* 1997; Chap. III: Mota-Meira *et al.* 1999). De plus, aucun mutant spontané résistant à la mutacine B-Ny266 n'a été obtenu jusqu'à présent. Des études réalisés par Dagrav (1996) afin d'obtenir des mutants spontanés ou induits par des agents mutagènes (rayons ultra-violets et nitrosoguanidine) de la souche de *M. luteus* ont démontré uniquement l'apparition de colonies avec une adaptation physiologique (très instable) à la mutacine plutôt qu'une véritable mutation. De nombreux essais effectués dans le laboratoire du Dr Lavoie afin d'obtenir des mutants résistants à la mutacine B-Ny266 sont également demeuré infructueux (résultats non-publiés).

La mutacine B-JH1140, produite par *S. mutans* JH1140 (« mutant spontané » de la souche *S. mutans* JH1000, a une masse moléculaire de  $2263,2 \pm 0,01$  Da (calculée par électro-ionisation). Cependant, la mutacine JH1000 produite par le *S. mutans* JH1000 possède une masse moléculaire inférieure à 1000 Da (déterminée par membrane à dialyse avec une porosité de 1000 Da). De plus, la migration de la mutacine B-JH1140 dans un gel d'électrophorèse (SDS-PAGE) fut plus lente que celle attendue selon son poids moléculaire. Ces contradictions apparentes sont dues au fait que la mutacine B-JH1140, comme les autres lantibiotiques, possède une conformation linéaire sous forme de « bâtonnet ». Cette conformation confère la capacité de passer au travers des pores des membranes à dialyse (même si les pores sont d'une taille inférieure à la masse moléculaire du peptide) et de retarder leur mobilité électrophorétique (Hillman *et al.* 1998).

La mutacine B-III, produite par *S. mutans* UA787, possède la même séquence du gène codant pour le pré-peptide (Qi *et al.* 1999b) que celle déterminée pour la mutacine B-JH1140 (Hillman *et al.* 1998). La localisation des ponts sulfures et des résidus déshydratés semble être la seule différence entre ces deux molécules. Qi *et al.* (1999b) a proposé que les résidus non-usuels de la mutacine B-III sont localisés à la même place que ceux qui ont été proposés pour la mutacine B-Ny266 (Fig. 1.4 et 3.1). La détermination de la localisation exacte des ponts sulfures de la mutacine B-III serait nécessaire pour déterminer qu'il s'agit de deux substances sont différentes.

Les mutacines B-Ny266, B-JH1140 et B-III sont des lantibiotiques de type A (Fig. 1.1; Tableau 1.1) semblables à l'épidermine et à la gallidermine (Chap. IV: Mota-Meira *et al.* 1997; Hillman *et al.* 1998; Qi *et al.* 1999b). Ces trois substances sont classées dans le groupe épidermine (Fig. 1.1). La mutacine B-JH1140 et la mutacine B-III diffèrent de la mutacine B-Ny266 par seulement deux acides aminés (Phe/Leu-6 et Lys/Arg-13). Toutefois, la mutacine B-JH1140 diffère encore de la mutacine B-Ny266 par la structure proposée des acides aminés non-usuels sauf ceux en C-terminal (Fig. 1.4; Chap. IV: Mota-Meira *et al.* 1997; Hillman *et al.* 1998). Par contre, la différence dans la séquence signal du gène *lanA* est de 6 résidus (Fig. 1.2) en position -9 à -12, -19 et -22 (G. LaPointe, communication personnelle). La séquence



en acides aminés pour les mutacines B-Ny266 et B-JH1140 a été obtenue par la dégradation d'Edman suite au traitement à l'éthanethiol alcalin. Une analyse supplémentaire pour la détection des résidus modifiés a été réalisée pour la mutacine B-JH1140 en utilisant la spectrométrie de masse (fragmentation de la molécule par MS/MS) suite au même traitement (Novak *et al.* 1996).

Le gène codant le peptide (*lanA*) et l'enzyme de modification (*lanB*) ont été séquencés pour les mutacines B-Ny266, B-JH1140 et B-III. De plus, le gène de l'enzyme de modification (*lanM*), de régulation (*lanR*), d'immunité (*lanF,E,G*) et de transport (*lanT*) ont été aussi séquencés pour la mutacine B-III (Qi *et al.* 1999b). Comme pour la mutacine B-Ny266 (G. LaPointe, communication personnelle), le peptide LanA ne semble pas avoir une séquence consensus autour du point de clivage du peptide signal comme pour la plupart des lantibiotiques de la classe AI. Comme pour les autres lantibiotiques de la classe AI, la mutacine B-JH1140 et la mutacine III possèdent un résidu hydrophobe (Pro) en position -4 et un résidu chargé négativement (Asp) en position -3. Par contre, la position -2 est occupée par un acide aminé polaire (Thr) au lieu d'un hydrophobe (Pro ou Ala). Elles conservent, cependant, le motif F(NL)D dans le peptide signal (Fig. 1.2). Même si le pré-peptide de 63 acides aminés est le plus long parmi les lantibiotiques de la classe AI, le peptide mature contient le même nombre de résidus (22) que le groupe épidermine.

La mutacine J-T8, produite par *S. mutans* T8, est un peptide hydrophobe de masse moléculaire de 3245 Da contenant dans sa structure quatre acides aminés non-usuels: deux lanthionines, un  $\beta$ -méthyllanthionine et un acide aminé déshydraté (soit dhA ou dhB; Tableau 1.1; Novak *et al.* 1996). Même si la séquence du gène du pro-peptide (27 résidus; Fig. 1.4) est connue, dans le peptide mature, seulement les huit premiers résidus ont été séquencés (Novak *et al.* 1994) et la position des acides aminés modifiés reste à être déterminée. Le gène du peptide (*lanA*), de l'enzyme de modification (*lanM*), de régulation (*lanR*), d'immunité (*lanF,E,G*) et de transport (*lanT*) ont été séquencés (Qi *et al.* 1999a; Woodruff *et al.* 1998). Le peptide signal (Fig. 1.2) a une séquence consensus avec les autres lantibiotiques du « type-GG » ou « classe AII » soit des double glycines autour du site de clivage, et des régions homologues conservées de motif (EVSxxELxxIxGG) typique de bactériocines de classe II

(non-lantibiotiques; Fig. 1.2). La mutacine J-T8 a un spectre d'activité semblable à celui de la mutacine C67-1 contre la plupart des bactéries à Gram positif testées par Parrot *et al.* (1990), à l'exception de *Listeria sp.*, de certains entérocoques et lactobacilles. Le mode d'action de ce lantibiotique semble différent de ceux de la classe A (qui consiste en la formation de pores dans la membrane cytoplasmique). La mutacine J-T8 interfère plutôt avec le métabolisme énergétique des cellules sensibles (Chikindas *et al.* 1995).

## **CHAPITRE II**

### **ACTIVITY OF BACTERIAL STRAINS PRODUCING MUTACINS OR LANTIBIOTICS AGAINST PATHOGENIC BACTERIA**

**Hélène Morency<sup>1</sup>, Marilaine Mota-Meira<sup>2</sup>, Diane Marion<sup>1</sup>, Danielle Tremblay<sup>1</sup>,  
Gisèle LaPointe<sup>2</sup>, Christophe Lacroix<sup>2</sup>, and Marc C. Lavoie<sup>1</sup>**

**Département de biochimie et de microbiologie, Faculté des sciences et de génie<sup>1</sup>, and  
Centre de recherche en sciences et technologie du lait (STELA), Faculté des sciences  
de l'agriculture et de l'alimentation<sup>2</sup>, Université Laval, Cité Universitaire, Québec,  
QC, Canada, G1K 7P4**

**Soumis à « Antimicrobial Agents and Chemotherapy »**

## 2.1. RÉSUMÉ

La fréquence d'apparition de souches pathogènes résistantes aux antibiotiques a augmenté, et constitue actuellement un problème majeur dans les milieux hospitaliers. De nouveaux antibiotiques plus efficaces doivent être développés pour lutter contre les maladies infectieuses. Le test d'antagonisme différé a été utilisé afin de déterminer l'activité de différentes souches productrices de mutacines ou de lantibiotiques contre des souches pathogènes. Les mutacines A, B, C, D, I, K, L et M, ainsi que les nisines A et Z sont actives contre tous les entérocoques testés. Les souches produisant les mutacines A ou B ainsi que les nisines A ou Z étaient actives contre tous les staphylocoques testés. À l'exception des souches productrices des mutacines P, Q et X, toutes les autres souches productrices inhibent les streptocoques testés. Les mutacines A, B, I, J et T, les nisines A et Z, et l'épidermine inhibent les deux souches de *Neisseria gonorrhoeae* résistantes aux antibiotiques. Les mutacines A, B, C et D et les nisines A et Z inhibent *Campylobacter jejuni* et *Helicobacter pylori*. Ces résultats confirment le spectre d'activité étendu des nisines A et Z, et ils indiquent que certaines mutacines, spécialement celles des groupes A, B, C, D, I, K, L et M, sont de bonnes candidates pour leur développement comme antibiotiques.

## 2.2. ABSTRACT

The increase of drug resistance among bacterial pathogens is currently a major threat in hospital settings. New and more efficient antibiotic compounds have to be developed in order to fight infectious diseases. In the present work, we used a deferred antagonism test to determine the activity of different bacterial strains producing either a mutacin or a lantibiotic against bacterial pathogens. The mutacins A, B, C, D, I, K, L and M, nisins A and Z were active against all enterococci tested. Mutacins A and B, and nisins A and Z inhibited all the staphylococci tested. Except for the strains producing mutacins P, Q and X, all the producing strains inhibited the streptococci tested. Mutacins A, B, I, J, T, nisins A and Z, and epidermin inhibited the two antibiotic-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* tested. Mutacins A, B, C, D, nisins A and Z inhibited *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori*. These results confirm the wide activity spectra of nisins A and Z, and indicate that some mutacins, especially those of groups A, B, C, D, I, K, L, and M, could be candidates for further development as useful antibiotics.

### 2.3. INTRODUCTION

The need to look for new antibacterial agents is motivated by the increase in drug resistance among bacterial pathogens (1, 3, 9, 16). Different strategies for finding new antimicrobial agents are actually envisioned (15, 20, 50), among which the area of antibacterial peptides is under intense investigation (15, 20, 52). Among promising antibacterial peptides are bacteriocins (22, 25) such as lantibiotics (24, 27). Lantibiotics are defined as bacterium-derived lanthionine-containing peptides with antibiotic activity (2, 24, 27, 39, 48). Their interest lies in the facts that they possess a mode of action different from the conventional antibiotics and that because they are small peptides, it is possible to chemically or genetically modify their structure in order to increase or diversify their already interesting properties (2, 6, 24, 25, 48). While working with *Streptococcus mutans*, we found that many of these strains produce antibacterial substances against oral streptococci (44). These substances were further shown to inhibit many Gram-positive and some Gram-negative bacteria (37, 42). Such inhibitory substances are generally referred to as bacteriocins and as mutacins for those produced by *S. mutans* (19). We previously classified mutacins into 24 groups based on their activity spectra against each other and their cross-immunity (37). Among the mutacins, only three (B-Ny266, B-JH1140 and J-T8) has been completely sequenced and were found to be lantibiotics (21, 38, 40, 55). In order to find good candidates for future development of new drugs against bacterial pathogens, including those that are drug resistant, we determined the activity spectra of distinct mutacins against a large variety of different pathogens. The results indicate that some mutacins, especially those of groups A, B, C, D, I, K, L, and M, could be candidates for further development as useful antibiotics.

## 2.4. MATERIALS AND METHODS

### 2.4.1. BACTERIAL STRAINS

The mutacin or lantibiotic producing strains and the strains tested for their sensitivity are listed in Tables 2.1 and 2.2, respectively.

### 2.4.2. DETERMINATION OF ACTIVITY SPECTRA

The activity spectra were determined by the deferred antagonism test as previously described (37, 42-44). The medium used as bottom agar was generally Trypticase Soy Agar (TSAYE), which consists of Trypticase Soy Broth (Difco, Detroit, MI), enriched with 0.3% yeast extract (Difco) and 1.5% Bacto-Agar (Difco). The other media used as top agar were TSAYE, Brain-Heart Infusion Agar (BHA, Difco) enriched with 1% supplement B (Difco) and 10% heated (85° C) defibrinated sheep blood for species of *Neisseria* and *Haemophilus*, BHA enriched with 5% Fetal Bovine Serum (Gibco BRL, Grand Island, NY) for *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni*. Finally, MRS agar (BDH Inc., Darmstadt, Germany) was used for *Pediococci*. The top layer contained 0.7% Bacto-Agar (Difco) instead of 1.5% as in the bottom layer, to facilitate the diffusion of the inhibitory substances.

The mutacin-producing strains were incubated anaerobically (10% H<sub>2</sub>: 10% CO<sub>2</sub>: 80% N<sub>2</sub>) in a Coy glove box (Model 12467, Coy Laboratory Products Inc., Ann Arbor, MI) at 37° C for 48 h. The lantibiotic-producing strains were incubated aerobically at 37°C for 48 h. The indicator strains in the top agar were generally incubated aerobically at 37°C for 24 h. The strains of *Actinomyces viscosus*, *Bordetella bronchiseptica*, *Clostridium sporogenes*, *Peptostreptococcus micros*, *Propionibacterium acnes*, and the streptococci were incubated at 37°C under anaerobic conditions (10% H<sub>2</sub>: 10% CO<sub>2</sub>: 80% N<sub>2</sub>) until a visible growth. The strains of *C. jejuni*, *H. influenzae*, *H. pylori*, and *N. gonorrhoeae* were incubated at 37°C under 10% CO<sub>2</sub> in a CO<sub>2</sub> incubator (Napco Controlled Environment 6100, National Appliance, Portland, OR) until growth was visible. *M. smegmatis* was incubated at room temperature under aerobic conditions.

The tests were done in triplicate and the results are reported as the mean radius of three inhibition zones measured from the edge of the colony of the producing strain to the margin of the inhibition zone (43). Only strains showing an inhibition zone with a radius greater than 1 mm were considered as sensitive (43). The results were analyzed as previously described (37) with the Progiel R (32) using the unstrain grouping of Lance and Williams and the Ward's method to calculate the percentage of similarity between the different activity spectra. This calculation of the percentage of similarity was based on the dimension of the inhibition zones including radii lower than 1 mm.

## 2.5. RESULTS

*Micrococcus luteus* appears to be the most sensitive indicator among the strains tested to detect mutacin or lantibiotic production (Table 2.3). Eight mutacins (A, B, C, D, I, K, L, M) and two lantibiotics (nisins A and Z) were active against all the enterococci tested including the multi-drug resistant strain (EF-Chul) (Table 2.3). In comparison to the other streptococci tested, the strain EF-Chul was more sensitive to mutacins E, F and O and more resistant to mutacin T and subtilin. *Peptostreptococcus micros* was inhibited by most of the tested strains except those producing epidermin, gallidermin and mutacins N, Q, and b (Table 2.3).

Only mutacins B-Ny266 and B-JH1140 and nisins A and Z were active against all staphylococci tested, while only one strain was resistant to mutacin A-CM7 (Table 2.4). The tested strains were generally active against most streptococci, while those producing mutacins of groups P, Q, X and b were the least effective among the inhibitory strains tested (Table 2.5). Only mutacins from four groups (A, B, C, D), nisin Z and subtilin were active against *Bacillus cereus* (Table 2.6). *Actinomyces viscosus* and *Corynebacterium diphtheriae* were sensitive to all strains tested, except for the subtilin-producing strain. Of the 30 strains tested, 23 inhibited *Clostridium sporogenes* and *Listeria monocytogenes* ATCC type strains, 17 inhibited *Gardnerella vaginalis* and *Propionibacterium acnes*, and 14 inhibited *L. monocytogenes* Scott A (Table 2.6). Only nisins A and Z, and epidermin were active against *Mycobacterium smegmatis* (Table 2.6).



None of the tested strains were active against species of *Bordetella* or *Haemophilus* (Table 2.7). Mutacins of group A, B, C, D, L and M, and nisins A and Z were active against *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori* (Table 2.7). *Neisseria gonorrhoeae* 016 was inhibited by the majority of the producing strains while *N. gonorrhoeae* 022 generally appeared less sensitive (Table 2.7).

Mutants of *Listeria monocytogenes* and *Pediococcus acidilactici* selected for their resistance to nisin did not seem to be significantly affected in their sensitivity towards mutacins. However, mutant R1M of *P. acidilactici* was slightly more resistant to mutacins of groups A, B, C and D, gallidermin and subtilin than the parent strain (Table 2.8).

According to their activity spectra against the bacterial pathogens used in the present tests, the mutacins can be classified into eleven clusters, using a similarity level of 85% to define a cluster (Figure 2.1). Although placed in different clusters, the mutacins of groups A, B, C and D are related to nisins, with a similarity in their activity spectra of 63% (Figure 2.1). Mutacins of groups G, H and J are related to epidermin, gallidermin, and subtilin with 81% similarity (Figure 2.1). The other mutacins formed different clusters which are less related to the lantibiotics tested (Figure 2.1). The percentage of similarity in the activity spectra between nisins A and Z was 83%, while that of epidermin and gallidermin were 99% similar, and that of mutacins B-Ny266 and B-JH1140 showed 94% similarity (Figure 2.1).

## 2.6. DISCUSSION

In the deferred antagonism tests, the detection of an inhibition zone and its size are dependent on many different factors (43). Therefore, data from these tests cannot be extrapolated to the properties of purified substances. Thus, it is not surprising to observe discrepancies between the present results and others obtained using the purified inhibitors (7, 10, 13, 26, 28, 36, 45, 53, 54). Nevertheless, under the conditions used, an inhibition zone with a radius greater than 1 mm should be considered as indication of the production of an inhibitor different from metabolic end-products (42, 43). Although the dimension of the inhibition zone depends on many factors, a wider inhibition zone could indicate that the substance is more

active, that it diffuses more rapidly and/or that it is produced in higher quantity, all these characteristics being important for the production of new antibiotics. The deferred antagonism test is only a crude evaluation of the production of antimicrobial substances, but it remains a convenient and easy method to screen for new antibacterial substances against a large variety of indicator strains.

In a previous paper (37), we defined the mutacin groups using both the activity spectra and the cross-immunity of the producing strains. Here, it was not possible to use the immunity because some of the lantibiotic-producing strains (Table 2.1) are not streptococci. Some species-related characteristics could confer resistance towards certain mutacins which have nothing to do with immunity. We thus calculated the percentage of similarity using only their activity spectra. As previously stated (37), the grouping of mutacins according to their activity spectra can only be considered as preliminary. The elucidation of their relationship will have to await the determination of the primary structure of the molecules as proposed for lantibiotics by Sahl *et al.* (48). Nevertheless, grouping based on data from this study largely agree with our previous grouping using activity patterns and cross-immunity among mutacinogenic strains (37). It will serve as a basis for further research on mutacins.

Bactericidal activity of lantibiotics is dependent, in part, on their secondary structure, which in turn is determined by their primary structure. The modification of only one amino acid has already been shown to alter the activity of certain lantibiotics (6, 33, 41, 47). Although nisin A and nisin Z differ in their primary structure by only one amino acid, the percentage of similarity of their activity spectra was only 83%. These results could be attributed, in part, to the greater diffusibility of nisin Z in solid agar medium, which leads to larger inhibition zones in the deferred antagonism tests compared to nisin A (10). However, only replacement of certain key amino acid residues has a significant effect on the activity spectra of lantibiotics, while substitution of others have no significant effect (33, 41). This is also observed in our study, as epidermin and gallidermin, which differ by one amino acid in their primary structure, show a very high (99%) percentage of similarity in their activity spectra. Furthermore, mutacins B-Ny266 and B-JH1140 differ by two amino acids in their primary structure, but exhibit activity spectra similar at 94%. These results indicate that studies on structure-activity

relationships are important for mutacins, as has been shown for other lantibiotics (6, 33, 41, 47).

Data presented here confirmed the wide activity spectra of lantibiotics nisin A and nisin Z against bacterial pathogens (22, 27, 45, 53). Nisin is currently studied for use as a clinical antibiotic (12). The other lantibiotics tested (epidermin, gallidermin, and subtilin) showed narrower activity spectra and their clinical use may be more limited.

Some mutacins showed promising activity spectra, appropriate for their eventual development as clinical antibiotics. In the present work, all the tested substances, except mutacins of groups P, Q and X, were highly active against streptococci and should thus be eventually studied for treatment of streptococcal infections.

The incidence of multi drug-resistant strains of enterococci is a growing problem in hospital environments (1, 3, 16). Of major concern is the emergence of vancomycin-resistant enterococci (VRE) (31). In the present work, multiresistant strains of enterococci, including one VRE strain, were shown to be sensitive to mutacins of groups A, B, C, D, I, K, L, and M. These substances should thus be eventually studied for their use against enterococcal infections.

The increasing presence of antibiotic-resistant strains of staphylococci is used to much a problem in hospital environments, especially so with the apparition of methicillin-resistant strains (MRSA) (29). The present results indicate that two groups of mutacin (A and B) could be recommended for the development of anti-staphylococcal agents. Multi-drug resistance is on the rise among *Neisseria* species (4). This study indicates that mutacins of groups A, B, I, J, and T, which inhibited *Neisseria* species, should be further examined for use against neisserial infections.

The lantibiotic nisin was shown to be active against *H. pylori* (14), and is presently being tested for treatment of peptic ulcers caused by *H. pylori* (12, 14). Many oral bacteria were also shown to inhibit the growth of *H. pylori* (23). Similarly, mutacins of groups A, B, C, D, J,

and L are shown here to inhibit *H. pylori*. These substances could thus be considered for their development towards peptic ulcer treatment.

As with nisin, it is also possible to consider mutacins as food preservative (12, 22, 27). The data of the present study indicate that mutacins of groups A, B, C, D, H, I, J, K, and M may be good candidates for food protection applications since they inhibit *Clostridium sporogenes* and *Listeria monocytogenes*. One drawback in using nisin as an antibiotic is associated with the selection of nisin-resistant mutants (8, 17, 34, 36). As shown in this work, resistance towards nisin does not apparently significantly affect the efficiency of mutacins A, B, C, D, K, and M. These mutacins could thus be used against nisin-resistant mutants. Otherwise, the use of a combination of both nisin and mutacin could prevent or delay the apparition of bacteriocin resistant mutants.

The results of the present study confirm the wide activity spectra of nisins A and Z, and indicate that some mutacins, especially those of groups A, B, C, D, I, K, L, and M, could be candidates for further development as useful antibiotics. Their inhibitory properties will, however, have to be confirmed using the purified substances. To date, only mutacins of groups B and J have been purified (21, 38, 40).

## **2.7. ACKNOWLEDGMENTS**

This work was funded by the Société Innovatech Chaudière-Appalache (Québec, QC, Canada). Thanks to CNPq (Brasil) for supporting (Scholarship) M. Mota-Meira.

## 2.8. REFERENCES

1. **ASM Task Force.** 1995. ASM Task Force on Antibiotic Resistance, Suppl. to Antimicrob. Agents Chemother. January. ASM Washington, D.C.
2. **Bierbaum, G., and H.-B. Sahl.** 1993. Lantibiotics - unusually modified bacteriocin-like peptides from Gram-positive bacteria. Zentralbl. Bakteriologie. **278**:1-22.
3. **Bryan, L. E. (ed.).** 1984. Antimicrobial Drug Resistance. Academic Press, Orlando, FL, 576 pp.
4. **Castro, I., M. G. Bergeron, and S. Chamberland.** 1993. Characterization of multiresistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Nicaragua. Sex. Transm. Dis. **20**:314-320.
5. **Caufield, P. W., G. Shah, S. K. Hollingshead, M. Parrot, and M. C. Lavoie.** 1990. Evidence that mutacin II production is not mediated by a 5.6-kb plasmid in *Streptococcus mutans*. Plasmid **24**:110-118.
6. **Chan, W. C., H. M. Dodd, N. Horn, K. Maclean, L.-Y. Lian, B. W. Bycroft, M. J. Gasson, and G. C. K. Roberts.** 1996. Structure-activity relationships in the peptide antibiotic nisin: role of dehydroalanine 5. Appl. Environ. Microbiol. **62**:2966-2969.
7. **Cintas, L. M., P. Casaus, M. F. Fernandez, and P. E. Hernandez.** 1998. Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and food pathogenic bacteria. Food Microbiol. **15**:289-298.
8. **Crandall, A. D., and T. J. Montville.** 1998. Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. Appl. Environ. Microbiol. **64**:231-237.
9. **Davies, J.** 1996. Bacteria on the rampage. Nature (London) **383**:219-221.
10. **de Vos, W. M., J. W. M. Mulders, R. J. Siezen, J. Hugenholtz, and O. P. Kuipers.** 1993. Properties of nisin Z and distribution of its gene, *nisZ*, in *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. **59**:213-218.

11. **Delisle, A. L.** 1986. Properties of mutacin b, an antibacterial substance produced by *Streptococcus mutans* strain BHT. *Microbios* **46**:21-28.
12. **Delves-Broughton, J. P. Blackburn, R. J. Evans, and J. Hugenholtz.** 1996. Applications of the bacteriocin nisin. *Antonie van Leeuwenhoek* **69**:193-202.
13. **Doel, G. R.** 1993. Dentifrice compositions. International Patent No: PCT/GB92/02348; international publication number WO 93/11738. New Horizons Court, Brentford, Middlesex, GB.
14. **Edwards, P. J., and K. Morwood.** 1996. Pharmaceutical compositions against gastric disorders. US Patent No: 5,559,096. Applied Microbiology Inc., New York.
15. **Fernandes, P. B.** 1995. Pharmaceutical perspective on the development of drugs to treat infectious diseases. *ASM News* **62**:21-24.
16. **Fox, J.** 1997. Antibiotic resistance on rise globally. *ASM News* **63**:655.
17. **Goulhen, F., J. Meghrous, and C. Lacroix.** 1998. Characterization of nisin-resistant variants of *Pediococcus acidilactici* UL5, a producer of pediocin. *J. Appl. Microbiol.* **85**:387-397.
18. **Goyette, N., M. Parrot, D. Sutzescu, M. Leduc, L. Dufour, L. Trahan, and M. C. Lavoie.** 1995. Inverse correlation between the proportion of salivary bacteria inhibiting *Streptococcus mutans* and the percentage of carious teeth. *J. Oral Pathol. Med.* **24**:462-467.
19. **Hamada, S., and T. Ooshima.** 1975. Production and properties of bacteriocins (mutacins) from *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.* **20**:641-648.
20. **Hancock, R. E. W.** 1997. Peptide antibiotics. *Lancet* **349**:418-422.
21. **Hillman, J. D., J. Novak, E. Sagura, J. A. Gutierrez, T. A. Brooks, P. J. Crowley, M. Hess, A. Azizi, K.-P. Leung, D. Cvitkovitch, and A. S. Bleiweis.** 1998. Genetic and biochemical analysis of mutacin 1140, a lantibiotic from *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* **66**:2743-2749.

22. **Hoover, D. G., and L. R. Steenson (ed.).** 1993. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*, 275 pp. Academic Press, Inc. San Diego. CA.
23. **Ishihara, K., T. Miura, R. Kimizuka, Y. Ebihara, Y. Mizuno, and K. Okuda.** 1997. Oral bacteria inhibit *Helicobacter pylori* growth. *FEMS Microbiol. Lett.* **152**:355-361.
24. **Jack, R. W., and H.-G. Sahl.** 1995. Unique peptide modifications involved in the biosynthesis of lantibiotics. *Trends Biotechnol.* **13**:269-278.
25. **Jack, R. W., J. R. Tagg, and B. Ray.** 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* **59**:171-200.
26. **Jung, G., R. Kellner, H. Zahner, F. Gotz, T. Horner, R. G. Werner, and H. Allgaier.** 1993. Polycyclic peptide antibiotic gallidermin. US Patent No: 5,231,013.
27. **Jung, J., and H.-G. Sahl (ed.).** 1991. *Nisin and Novel Lantibiotics*, 490 pp. ESCOM, Leiden, The Netherlands.
28. **Kellner, R., G. Jung, T. Horner, H. Zahner, N. Schnell, K.-D. Entian, and F. Gotz.** 1988. Gallidermin: a new lanthionine-containing polypeptide antibiotic. *Eur. J. Biochem.* **177**:53-59.
29. **Kloos, W. E., and T. L. Bannerman.** 1995. *Staphylococcus* and *Micrococcus*, p. 282-298. *In* P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.). *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
30. **Kulkarni, G. V., K. H. Chan, and H. J. Sandham.** 1989. An investigation into the use of restriction endonuclease analysis for the study of transmission of mutans streptococci. *J. Dent. Res.* **68**:1155-1161.
31. **Leclerc, R., E. Derlot, J. Duval, and P. Courvalin.** 1988. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N. Engl. J. Med.* **319**:157-161.
32. **Legendre, P., and A. Vaudor.** 1991. *Le progiciel R analyse multidimensionnelle, analyse spatiale*. Département des Sciences Biologiques, Université de Montréal, Montréal QC, Canada.

33. **Liu, W., and N. Hansen.** 1993. The antimicrobial effect of a structural variant of subtilin against outgrowing *Bacillus cereus* T spores and vegetative cells occurs by different mechanisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:648-651.
34. **Mazzotta, A., and T. J. Montville.** 1997. Nisin induces changes in membrane fatty acid composition of *Listeria monocytogenes* nisin-resistant strains at 10° C and 30° C. *J. Appl. Microbiol.* **82**:32-38.
35. **Meghrou, J., C. Lacroix, M. Bouksaim, G. LaPointe, and R. E. Simard.** 1997. Genetic and biochemical characterization of nisin Z produced by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* UL 719. *J. Appl. Microbiol.* **83**:133-138.
36. **Ming, X., and M. A. Daeschel.** 1993. Nisin resistance of foodborne bacteria and the specific resistance responses of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Food Prot.* **56**:944-948.
37. **Morency, H., L. Trahan, and M. C. Lavoie.** 1995. Preliminary grouping of mutacins. *Can. J. Microbiol.* **41**:826-831.
38. **Mota-Meira, M., C. Lacroix, G. LaPointe, and M. C. Lavoie.** 1997. Purification and structure of mutacin B-Ny266: a new lantibiotic produced by *Streptococcus mutans*. *FEBS Lett.* **410**:275-279.
39. **Nes, I. F., and J. R. Tagg.** 1996. Novel lantibiotics and their pre-peptides. *Antonie van Leeuwenhoek* **69**:89-97.
40. **Novak, J., P. W. Caufield, and E. J. Miller.** 1994. Isolation and biochemical characterization of a novel lantibiotic mutacin from *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **176**:4316-4320.
41. **Ottenwalder, B., T. Kupke, S. Brecht, V. Gnau, J. Metzger, G. Jung, and F. Gotz.** 1995. Isolation and characterization of genetically engineered gallidermin and epidermin analogs. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3894-3903.
42. **Parrot, M., P. W. Caufield, and M. C. Lavoie.** 1990. Preliminary characterization of four bacteriocins from *Streptococcus mutans*. *Can. J. Microbiol.* **36**:123-130.



43. **Parrot, M., M. Charest, and M. C. Lavoie.** 1989. Production of mutacin-like substances by *Streptococcus mutans*. *Can. J. Microbiol.* **35**:366-372.
44. **Parrot, M., M.-F. Drean, L. Trahan, and M. C. Lavoie.** 1990. Incidence of bacteriocinogeny among fresh isolates of *Streptococcus mutans*. *Can. J. Microbiol.* **36**:507-509.
45. **Ray, B.** 1992. Nisin of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* as a food biopreservative, p 207-264. *In* B. Ray, and M. Daeschel (ed.), *Food biopreservatives of microbial origin*. CRC Press, Boca Raton, FL.
46. **Rodrigue, L., and M. C. Lavoie.** 1995. Comparison of the proportions of oral bacterial species in BALB/c mice from different suppliers. *Lab. Animals* **30**:108-113.
47. **Rollema, H. S., O. P. Kuipers, P. Both, W. M. de Vos, and R. J. Siezen.** 1995. Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2873-2878.
48. **Sahl, H.-G., R. W. Jack, and G. Bierbaum.** 1995. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *Eur. J. Biochem.* **230**:827-853.
49. **Sahm, D. F.** 1995. The role of clinical microbiology in the control and surveillance of antimicrobial resistance. *ASM News* **62**:25-29.
50. **Silver, L. L., and K. A. Bostian.** 1993. Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:377-383.
51. **Trudel, L., L. St-Amand, M. Bareil, P. Cardinal, and M. C. Lavoie.** 1986. Bacteriology of the oral cavity of BALB/c mice. *Can. J. Microbiol.* **32**:673-678.
52. **Tytler, E. M., G. M. Anantharamaiah, D. E. Walker, V. K. Mishra, M. N. Palgunachari, and J. P. Segrest.** 1995. Molecular basis for prokaryotic specificity of magainin-induced lysis. *Biochem. J.* **34**:4393-4401.

53. **Valenta, C., A. Bernkop-Schnurch, and H. P. Rigler.** 1996. The antistaphylococcal effect of nisin in a suitable vehicle: a potential therapy for atopic dermatitis in man. *J. Pharm. Pharmacol.* **48**:988-991.
54. **Werner, R. G., H. Zahner, G. Jung, H. Allgaier, and U. Schneider.** 1990. Antibiotic polypeptide, process for preparing it and the use thereof. Canadian Patent No: 1,277,617.
55. **Woodruff, W. A., J. Novak, and P. W. Cauffield.** 1998. Sequence analysis of *mutA* and *mutM* genes involved in the biosynthesis of the lantibiotic mutacin II in *Streptococcus mutans*. *Gene* **206**:37-43.

**Table 2.1. Inhibitory strains used in this study.**

<b>Producing strains</b>	<b>Mutacin or lantibiotic</b>	<b>Origin or source<sup>a</sup></b>
<i>Streptococcus mutans</i>		
CM7	<b>A-CM7</b>	C. Mouton
Ny266 (ATCC 202022)	<b>B-Ny266</b>	J. S. van der Hoeven
7A	<b>C-7A</b>	Parrot <i>et al.</i> (43)
123.1	<b>D-123.1</b>	Morency <i>et al.</i> (37)
Q	<b>E-Q</b>	Kulkarni <i>et al.</i> (30)
59.1	<b>F-59.1</b>	Morency <i>et al.</i> (37)
UA96	<b>G-UA96</b>	Caufield <i>et al.</i> (5)
29B	<b>H-29B</b>	Parrot <i>et al.</i> (43)
T9	<b>I-T9</b>	D. Kandelman
T8	<b>J-T8</b>	J. S. van der Hoeven
N	<b>K-N</b>	Kulkarni <i>et al.</i> (30)
87.1	<b>L-87.1</b>	Morency <i>et al.</i> (37)
5A	<b>M-5A</b>	Parrot <i>et al.</i> (43)
ATCC 25175	<b>N-25175</b>	ATCC
11A	<b>O-11A</b>	Parrot <i>et al.</i> (43)
136.1	<b>P-136.1</b>	Morency <i>et al.</i> (37)
JB	<b>Q-JB</b>	Kulkarni <i>et al.</i> (30)
3B	<b>R-3B</b>	Parrot <i>et al.</i> (43)
Ny257	<b>S-Ny257</b>	J. S. van der Hoeven
22A	<b>T-22A</b>	Parrot <i>et al.</i> (43)
F	<b>U-F</b>	Kulkarni <i>et al.</i> (30)
NG003	<b>W-NG003</b>	Goyette <i>et al.</i> (18)
T7B	<b>X-T7B</b>	Parrot <i>et al.</i> (43)
JH 1140	<b>B-JH 1140</b>	Hillman <i>et al.</i> (21)
BHT	<b>b</b>	Delisle (11)

**Table 2.1. Inhibitory strains used in this study (continued)**

<b>Producing strains</b>	<b>Mutacin or lantibiotic</b>	<b>Origin or source<sup>a</sup></b>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454	<b>Nisin A</b>	ATCC
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> UL 719	<b>Nisin Z</b>	Meghrous <i>et al.</i> (35)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> DSM 3095	<b>Epidermin</b>	DSM
<i>Staphylococcus gallinarum</i> DSM 4616	<b>Gallidermin</b>	DSM
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<b>Subtilin</b>	ATCC

<sup>a</sup> C. Mouton, Faculté de médecine dentaire, Université Laval, Québec, QC, Canada; J. S. van der Hoeven, Department of Preventive Dentistry, University of Nijmegen, Nijmegen, The Netherlands; D. Kandelman, Faculté de médecine dentaire, Université de Montréal; ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA; DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany.

**Table 2.2. Bacterial pathogens tested for their sensitivity towards mutacins and lantibiotics.**

Strains	Origin or source <sup>a</sup>	Resistance <sup>b</sup>
<i>Actinomyces viscosus</i> Nyl	J. S. Van der Hoeven	
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 2	ATCC	
<i>Bordetella bronchiseptica</i> LSPQ 2021	LSPQ	
<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 29428	ATCC	
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 19404	ATCC	
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> LSPQ 3076	LSPQ	
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 27275	ATCC	L-NA-N-OX-PB-S-G-TE
<i>E. faecalis</i> EF-Chul	CHUL	E-GM-K-L-NA-N-OX-PB-S-G-TE-TMP-VA
<i>E. faecalis</i> 78.4	Trudel <i>et al.</i> (51)	L-NA-N-OX-PB-S-G
<i>E. hirae</i> ATCC 8043	ATCC	CF-L-NA-N-OX-PB-SG
<i>Gardnerella vaginalis</i> ATCC 14018	ATCC	
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 8142	ATCC	
<i>Helicobacter pylori</i> ATCC 43504	ATCC	
<i>H. pylori</i> NCTC 11638	NCTC	
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	ATCC	
<i>L. monocytogenes</i> Scott A ATCC 700301	ATCC	Nisin (34)
<i>L. monocytogenes</i> Scott A ATCC 700302	ATCC	Nisin (8, 34)
<i>L. monocytogenes</i> Scott A HPB 3	HPB	
<i>L. monocytogenes</i> ser. 3 ATCC 19113	ATCC	
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 272	ATCC	
<i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC 35797	ATCC	
<i>M. smegmatis</i> ATCC 35798	ATCC	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> 016	Castro <i>et al.</i> (4)	AM-L-OX-P
<i>N. gonorrhoeae</i> 022	Castro <i>et al.</i> (4)	L-N-OX-P-PB-G-TMP-VA

**Table 2.2. Bacterial pathogens tested (continued)**

<b>Strains</b>	<b>Origin or source<sup>c</sup></b>	<b>Resistance<sup>b</sup></b>
<i>Pediococcus acidilactici</i> UL5	Goulhen <i>et al.</i> (17)	
<i>P. acidilactici</i> R1	Goulhen <i>et al.</i> (17)	Nisin
<i>P. acidilactici</i> R1M	Goulhen <i>et al.</i> (17)	Nisin
<i>P. acidilactici</i> T5	Goulhen <i>et al.</i> (17)	Nisin
<i>Peptostreptococcus micros</i> ATCC 33270	ATCC	
<i>Propionibacterium acnes</i> UD	D. Grenier	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	ATCC	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	ATCC	
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	ATCC	AM-P
<i>S. aureus</i> R621	CHUL	AM-E-OX-P
<i>S. aureus</i> R630	CHUL	AM-OX-P
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	ATCC	AM-P-G-TE
<i>S. epidermidis</i> SE-Chul	CHUL	AM-NA-P
<i>S. haemolyticus</i> HL 2344	HL	AM-C-E-K-L-NA-OX-P-S-TE-TMP
<i>Streptococci</i> group C LSPQ 3377	LSPQ	
<i>Streptococci</i> group F LSPQ 3374	LSPQ	
<i>Streptococci</i> group G LSPQ 3375	LSPQ	
<i>Streptococcus agalactiae</i> BALB/c	Rodrigue and Lavoie (46)	
<i>S. bovis</i> ATCC 35034	ATCC	
<i>S. mutans</i> ATCC 33534	ATCC	
<i>S. mutans</i> ATCC 35668	ATCC	
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 6303	ATCC	
<i>S. pneumoniae</i> ULM	CHUL	
<i>S. pyogenes</i> ULM	CHUL	
<i>S. suis</i> serotype 2	GREMIP	
<i>S. uberis</i> ATCC 27958	ATCC	

- <sup>a</sup> J. S. Van der Hoeven, Department of Preventive Dentistry, University of Nijmegen, Nijmegen, The Netherlands; ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA; LSPQ, Laboratoire de santé publique du Québec, Ste-Anne-de-Bellevue, QC, Canada; CHUL, Centre hospitalier de l'Université Laval, Laboratoire d'infectiologie, Ste-Foy, QC, Canada; NCTC, National Collection of Type Cultures, London, England; HPB, Health Protection Branch, Health Canada, Ottawa, ON, Canada; D. Grenier, Faculté de Médecine Dentaire, Université Laval, Québec, QC, Canada; HL, Hôpital Laval, Québec, QC, Canada; GREMIP, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, QC, Canada.
- <sup>b</sup> AM= ampicillin, CF= cephalotin, C= chloramphenicol, E= erythromycin, GM= gentamycin. K= kanamycin, L= lincomycin, NA= nalidixic acid, N= neomycin, OX= oxacillin, P= penicillin, PB= polymyxin B, RA= rifampin, S= streptomycin, G= sulfisoxazole, TE= tetracycline, TMP= trimethoprim, VA= vancomycin.

**Table 2.3. Activity<sup>a</sup> of bacterial strains producing a mutacin or a lantibiotic against micrococci, peptostreptococci and enterococci.**

	enterococci			<i>Micrococcus</i>	<i>Peptostreptococcus</i>	
	<i>E. faecalis</i>		<i>E. hirae</i>	<i>luteus</i>	<i>micros</i>	
	ATCC <sup>b</sup>		ATCC <sup>b</sup>	ATCC 272	ATCC 33270	
	78.4	27275	EF-Chul	8043		
<b>Mutacin</b>						
A-CM7	6	3	4	4	12	11
B-Ny266	6	2	3	4	15	12
B-JH 1140	6	1	2	4	13	7
C-7A	5	3	4	3	11	14
D-123.1	6	3	4	4	12	16
E-Q	1	1	9	1	5	3
F-59.1	1	1	10	0	14	2
G-UA96	0	0	1	1	13	15
H-29B	1	0	0	1	15	18
I-T9	5	6	4	6	6	3
J-T8	0	0	0	1	16	18
K-N	3	3	3	3	4	9
L-87.1	2	2	3	2	3	4
M-5A	3	4	4	4	6	9
N-25175	0	0	1	1	3	1
O-11A	1	1	4	1	11	2
P-136.1	1	0	1	1	3	2
Q-JB	0	0	1	1	2	1
R-3B	0	0	1	1	2	2
S-Ny257	1	0	1	1	3	3
T-22A	5	4	1	5	6	4
U-F	0	1	1	0	2	2
W-NG003	0	0	0	0	3	2
X-T7B	1	1	1	1	4	2
b-BHT	1	0	0	0	3	1
<b>Lantibiotic</b>						
Nisin A	6	6	6	8	14	7
Nisin Z	7	9	8	11	17	13
Epidermin	0	0	0	0	18	0
Gallidermin	0	0	0	0	18	1
Subtilin	5	2	0	3	10	4

<sup>a</sup> The activity is expressed as the mean of the radius of three inhibition zones in mm.

The average standard deviation on these measures was 0.4 mm.

<sup>b</sup> Multi-drug resistant strains (see Table 2).



**Table 2.4. Activity<sup>a</sup> of bacterial strains producing a mutacin or a lantibiotic against staphylococci.**

	<i>S. aureus</i>					<i>S. epidermidis</i>		<i>S. haemolyticus</i>
	ATCC			R621 <sup>b</sup>	R630 <sup>b</sup>	ATCC		HL 2344 <sup>b</sup>
	25923	43300 <sup>b</sup>	6538			12228 <sup>b</sup>	Chul <sup>b</sup>	
<b>Mutacin</b>								
A-CM7	3	2	5	1	5	4	3	6
B-Ny266	5	2	6	4	7	5	5	7
B-JH 1140	7	6	7	7	8	6	5	6
C-7A	1	0	5	1	5	4	5	5
D-123.1	2	0	5	1	5	4	5	5
E-Q	1	0	1	0	0	0	1	0
F-59.1	1	0	1	0	0	1	1	0
G-UA96	2	1	1	0	1	0	0	3
H-29B	1	0	1	0	1	1	0	5
I-T9	1	1	1	0	1	0	0	0
J-T8	1	0	1	0	1	1	0	4
K-N	1	0	0	0	0	2	2	1
L-87.1	1	1	2	1	1	2	3	3
M-5A	0	0	0	0	0	3	3	1
N-25175	0	0	0	0	0	0	0	0
O-11A	0	0	0	0	0	0	0	0
P-136.1	0	0	0	0	0	0	0	0
Q-JB	0	0	0	0	0	0	0	0
R-3B	0	0	1	0	1	0	0	0
S-Ny257	0	0	0	0	0	0	0	0
T-22A	0	0	1	0	1	1	0	1
U-F	1	0	2	0	0	0	0	0
W-NG003	0	0	0	0	0	0	0	0
X-T7B	0	0	1	0	0	1	1	1
b-BHT	0	0	0	0	1	0	0	0
<b>Lantibiotic</b>								
Nisin A	4	2	7	4	7	6	7	4
Nisin Z	7	5	11	7	11	8	12	6
Epidermin	3	0	0	0	2	0	NA <sup>c</sup>	0
Gallidermin	2	0	1	0	5	0	0	0
Subtilin	2	1	1	0	2	1	0	0

<sup>a</sup> The activity is expressed as the mean of the radius of three inhibition zones in mm.

The average standard deviation on these measures was 0.2 mm.

<sup>b</sup> Multi-drug resistant strains (see Table 2).

<sup>c</sup> Not available.

**Table 2.5. Activity<sup>a</sup> of bacterial strains producing a mutacin or a lantibiotic against streptococci.**

	<i>Streptococci</i>											
	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. bovis</i>	group			<i>S. mutans</i>		<i>S. pneumoniae</i>		<i>S. pyogenes</i>	<i>S. suis</i>	<i>S. uberis</i>
	BALB/c	ATCC 35034	C	F	G	ATCC 33534	ATCC 35668	ATCC 6303	ULM	ULM	serotype 2	ATCC 27958
<b>Mutacin</b>												
<b>A-CM7</b>	6	8	8	7	7	7	7	8	11	8	6	9
<b>B-Ny266</b>	10	11	10	8	8	7	9	8	12	8	8	12
<b>B-JH 1140</b>	9	11	9	8	7	7	9	7	12	7	7	12
<b>C-7A</b>	10	12	10	10	11	9	7	10	13	9	10	14
<b>D-123.1</b>	10	12	11	11	11	10	7	10	15	10	12	14
<b>E-Q</b>	1	12	18	20	3	1	2	3	4	15	5	6
<b>F-59.1</b>	6	13	18	21	11	8	1	2	3	16	3	10
<b>G-UA96</b>	4	7	6	6	6	7	2	6	10	7	8	9
<b>H-29B</b>	7	10	8	8	8	9	1	9	14	9	10	12
<b>I-T9</b>	12	9	7	2	7	1	2	5	6	7	12	13
<b>J-T8</b>	5	10	9	6	6	8	1	9	13	10	10	12
<b>K-N</b>	4	3	4	4	4	4	2	6	6	4	5	5
<b>L-87.1</b>	3	2	4	3	3	1	2	6	5	3	4	4
<b>M-5A</b>	5	3	5	6	5	7	2	7	6	5	7	6
<b>N-25175</b>	7	5	5	6	6	7	2	4	4	5	6	13
<b>O-11A</b>	2	9	17	18	7	1	1	3	2	14	2	5
<b>P-136.1</b>	1	1	4	1	1	1	1	3	3	1	3	4
<b>Q-JB</b>	1	2	2	1	3	2	2	2	2	2	2	2
<b>R-3B</b>	6	6	3	2	3	1	2	2	3	2	6	9
<b>S-Ny257</b>	6	8	9	3	10	6	3	4	4	7	9	10
<b>T-22A</b>	1	7	4	3	4	3	2	5	7	6	4	4
<b>U-F</b>	3	1	2	2	2	2	2	3	3	2	4	6
<b>W-NG003</b>	5	3	3	4	4	7	2	4	4	5	7	10
<b>X-T7B</b>	1	1	2	3	1	1	1	3	3	2	3	3
<b>b-BHT</b>	1	3	14	16	11	0	1	2	3	11	5	1

Table 2.5. Activity\* against streptococci (cont.)

Lantibiotic	Streptococci														
	<i>S. agalactiae</i>			<i>S. bovis</i> group			<i>S. mutans</i>		<i>S. pneumoniae</i>		<i>S. pyogenes</i>		<i>S. suis</i>		<i>S. uberis</i>
	BALB/c	ATCC 35034	ATCC 35034	C	F	G	ATCC 33534	ATCC 35668	ATCC 6303	ULM	ULM	ULM	serotype 2	ATCC 27958	
Nisin A	8	1	3	2	3	6	1	1	7	9	4	8	8	8	
Nisin Z	12	2	5	4	3	7	1	1	9	14	5	12	12	12	
Epidermin	9	10	7	1	6	7	4	4	5	8	7	4	4	10	
Gallidermin	9	10	7	2	8	7	5	5	4	10	8	5	5	10	
Subtilin	7	4	7	8	9	6	0	0	11	12	8	8	8	9	

\* The activity is expressed as the mean of the radius of three inhibition zones in mm.  
The average standard deviation on these measures was 0.6 mm.

**Table 2.6. Activity<sup>a</sup> of bacterial strains producing a mutacin or a lantibiotic against Gram positive rods.**

	<i>B. cereus</i>	<i>C. sporogenes</i>	<i>A. viscosus</i>	<i>C.</i>	<i>G. vaginalis</i>	<i>P. acnes</i>	<i>L. monocytogenes</i>			<i>M. smegmatis</i>	
	ATCC	ATCC		<i>diphtheriae</i>	ATCC						
	2	19404	Ny1	LSPQ 3076	14018	UD	ATCC 15313	Scott A 19113	HPB 3	ATCC 35797	35798
<b>Mutacin</b>											
A-CM7	2	5	8	6	13	7	9	10	7	1	0
B-Ny266	3	6	8	8	16	10	10	10	7	2	1
B-JH 1140	4	6	6	7	18	9	9	8	6	1	0
C-7A	3	13	11	10	12	6	7	9	4	1	0
D-123.1	4	13	12	11	13	8	8	10	5	1	1
E-Q	0	2	2	2	3	1	1	2	1	1	0
F-59.1	0	1	2	2	1	1	2	2	1	0	0
G-UA96	0	2	6	3	10	2	2	4	1	1	0
H-29B	0	3	8	6	13	2	3	8	2	1	1
I-T9	0	2	4	2	1	2	10	7	2	1	0
J-T8	0	2	9	7	15	1	4	7	2	1	1
K-N	1	4	6	5	3	8	5	4	3	1	1
L-87.1	0	4	4	3	3	4	4	3	1	0	0
M-5A	1	4	6	6	4	8	7	6	5	1	1
N-25175	0	1	3	2	1	1	1	1	1	0	0
O-11A	0	2	2	2	1	1	1	1	0	0	0
P-136.1	0	1	4	2	1	1	5	2	1	1	1
Q-JB	0	2	2	1	1	2	1	1	0	1	0
R-3B	0	2	2	2	1	1	1	1	1	1	0
S-Ny257	0	3	4	2	1	2	3	1	1	1	0
T-22A	0	3	3	7	5	3	7	5	1	1	1
U-F	0	2	3	2	1	2	1	1	0	0	0
W-NG003	0	1	3	2	1	1	2	2	1	1	1
X-T7B	0	2	4	3	1	1	6	3	0	1	1
b-BHT	0	1	2	3	1	0	1	1	1	0	0

**Table 2.6. Activity<sup>a</sup> against Gram positive rods (cont.)**

	<i>B. cereus</i>	<i>C. sporogenes</i>	<i>A. viscosus</i>	<i>C. diphtheriae</i>	<i>G. vaginalis</i>	<i>P. acnes</i>	<i>L. monocytogenes</i>		<i>M. smegmatis</i>		
	ATCC 2	ATCC 19404	Nyl	LSPQ 3076	ATCC 14018	UD	ATCC 15313	Scott A 19113	HPB 3	ATCC 35797	ATCC 35798
<b>Lantibiotic</b>											
<b>Nisin A</b>	1	6	2	2	8	11	5	9	4	4	3
<b>Nisin Z</b>	4	8	4	4	15	15	7	12	7	9	8
<b>Epidermin</b>	0	1	4	5	10	0	7	8	3	3	2
<b>Gallidermin</b>	0	1	2	5	12	0	6	7	2	0	0
<b>Subtilin</b>	4	5	1	0	9	15	2	7	0	2	1

<sup>a</sup> The activity is expressed as the mean of the radius of three inhibition zones in mm.

The average standard deviation on these measures was 0.4 mm.

**Table 2.7. Activity<sup>a</sup> of bacterial strains producing a mutacin or a lantibiotic against Gram-negative pathogens.**

	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>H. influenzae</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>H. pylori</i>	<i>N. gonorrhoeae</i>		
	LSPQ 2021	ATCC 8142	ATCC 29428	ATCC 43504	NCTC 11638	016 <sup>b</sup>	022 <sup>b</sup>
<b>Mutacin</b>							
A-CM7	1	1	8	8	8	8	2
B-Ny266	1	1	11	9	8	9	4
B-JH 1140	0	1	9	8	7	9	4
C-7A	0	0	4	2	11	1	1
D-123.1	0	1	5	2	12	3	1
E-Q	1	1	0	1	0	3	1
F-59.1	0	0	1	0	0	2	1
G-UA96	0	0	1	1	5	2	1
H-29B	0	0	1	1	8	3	1
I-T9	1	1	1	1	1	3	2
J-T8	0	1	1	2	7	6	2
K-N	0	0	3	4	0	1	1
L-87.1	0	0	3	3	3	2	1
M-5A	0	1	4	5	0	1	0
N-25175	0	0	0	0	0	1	1
O-11A	0	0	0	0	0	1	1
P-136.1	0	1	0	0	0	2	0
Q-JB	0	1	0	0	0	1	0
R-3B	0	1	1	1	0	0	1
S-Ny257	0	1	0	0	1	2	1
T-22A	1	1	0	0	1	4	2
U-F	0	1	1	1	0	3	1
W-NG003	1	1	0	0	0	1	1
X-T7B	1	1	0	0	0	2	1
b-BHT	0	0	0	0	0	2	2
<b>Lantibiotic</b>							
Nisin A	0	0	4	10	3	4	3
Nisin Z	0	1	5	13	3	8	3
Epidermin	0	0	1	0	6	6	2
Gallidermin	0	0	2	1	NA <sup>c</sup>	6	0
Subtilin	0	0	1	NA	NA	NA	NA

<sup>a</sup> The activity is expressed as the mean of the radius of three inhibition zones in mm.

The average standard deviation on these measures was 0.3 mm.

<sup>b</sup> Multi-drug resistant strains (see Table 2).

<sup>c</sup> Not available.

**Table 2.8. Activity<sup>a</sup> of bacterial strains producing a mutacin or a lantibiotic against nisin resistant mutants.**

	<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A			<i>Pediococcus acidilactici</i>			
	HPB 3	Resistant mutants		UL5	Resistant mutants		
		ATCC 700301	ATCC 700302		T5	R1	R1M
<b>Mutacin</b>							
A-CM7	7	8	7	8	9	7	6
B-Ny266	7	8	8	10	10	9	7
B-JH 1140	6	7	6	10	9	7	7
C-7A	4	5	4	10	7	8	8
D-123.1	5	6	5	11	8	9	8
E-Q	1	2	1	0	1	0	0
F-59.1	1	1	1	0	1	1	0
G-UA96	1	1	1	1	1	0	0
H-29B	2	1	1	2	1	1	1
I-T9	2	2	2	0	0	1	0
J-T8	2	2	1	2	2	1	1
K-N	3	4	3	4	3	4	4
L-87.1	1	2	1	2	1	3	2
M-5A	5	5	4	5	4	4	6
N-25175	1	1	1	0	0	0	0
O-11A	0	1	0	0	0	1	0
P-136.1	1	1	1	1	0	0	0
Q-JB	0	1	1	0	0	0	0
R-3B	1	1	1	0	0	0	0
S-Ny257	1	1	1	0	1	0	0
T-22A	1	2	1	0	1	0	0
U-F	0	1	1	0	1	1	1
W-NG003	1	1	1	0	0	0	0
X-T7B	0	2	2	1	0	1	1
b-BHT	1	1	1	0	0	0	0
<b>Lantibiotic</b>							
Nisin A	4	3	2	12	6	4	2
Nisin Z	7	3	2	15	7	5	3
Epidermin	3	6	5	6	5	4	5
Gallidermin	2	5	4	6	3	1	0
Subtilin	0	0	0	5	NA <sup>b</sup>	0	0

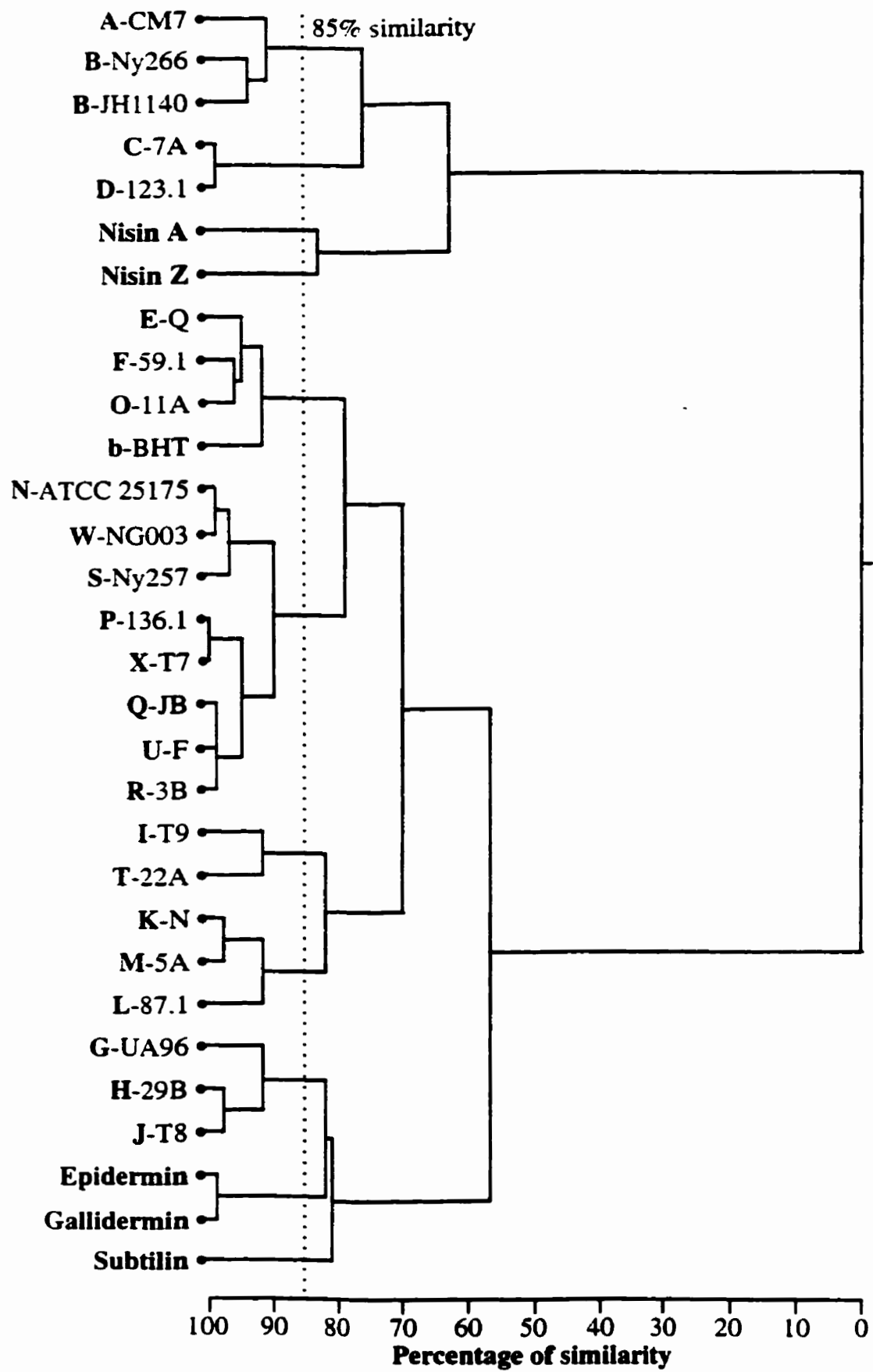
<sup>a</sup> The activity is expressed as the mean of the radius of three inhibition zones in mm.

The average standard deviation on these measures was 0.3 mm.

<sup>b</sup> Not available.

**Figure 2.1. Grouping of the lantibiotic- or mutacin-producing strains according to the similarity of their activity spectra against the tested pathogen strains bacterial.**





**CHAPITRE III****PURIFICATION AND STRUCTURE OF MUTACIN B-NY266: A NEW  
LANTIBIOTIC PRODUCED BY *STREPTOCOCCUS MUTANS***

**Marilaine Mota-Meira<sup>a</sup>, Christophe Lacroix<sup>a</sup>, Gisèle LaPointe<sup>a</sup> and Marc C. Lavoie<sup>b,\*</sup>**

**Centre de recherche en sciences et technologie du lait (STELA), Faculté des sciences de  
l'agriculture et de l'alimentation<sup>a</sup>, and Département de biochimie et de  
microbiologie, Faculté des sciences et de génie<sup>b</sup>, Université Laval, Cité  
Universitaire, Québec, QC, Canada, G1K 7P4**

Publié dans « FEBS Letters » 410:257-279, 1997

### 3.1. RÉSUMÉ

Les mutacines sont des substances antibactériennes de nature protéique produites par *Streptococcus mutans*. Les lantibiotiques sont des substances antibactériennes qui contiennent des acides aminés modifiés après traduction, comme les lanthionines. La mutacine B-Ny266 a été purifiée à partir de culots bactériens de la souche de *Streptococcus mutans* Ny266 par extraction à l'éthanol à pH 2,0 suivie de chromatographie à phase inverse sur des colonnes pré-compactées (« Sep-Pak® cartridge ») C<sub>18</sub> et par HPLC avec une colonne C<sub>18</sub>. Le facteur de purification moyen a été de  $3240 \pm 81$  avec un rendement moyen de  $1.0 \pm 0.1\%$ . La masse moléculaire de la mutacine B-Ny266 déterminée par la spectroscopie de masse, est de  $2270.29 \pm 0.21$  Da. La séquence en acides aminés, déterminée à partir de la fraction pure et active, a été obtenue par la dégradation d'Edman suite au traitement de la mutacine à l'éthanol alcalin. Vingt-et-un résidus ont été détectés par cette analyse. La séquence proposée est: F-K-A-W-U-F-A-~~Abu~~-P-G-A-A-K-O-G-A-F-N-U-Y-A. La séquence de la molécule diffère de celles de l'épidermine/staphylococcine 1580 et de la gallidermine en positions 1, 2, 4, 5 et 6. La mutacine B-Ny266 fait partie des lantibiotiques de type A.

### 3.2. ABSTRACT

Mutacins are bactericidal substances of proteinaceous nature produced by *Streptococcus mutans*. Lantibiotics are antibacterial substances containing posttranslationally modified amino acids such as lanthionine. Mutacin B-Ny266 was purified from the cell pellet of *Streptococcus mutans* strain Ny266 by ethanol extraction at pH 2.0 followed by reversed-phase chromatography (Sep-Pak® cartridge) and by HPLC on a C<sub>18</sub> column. The mean purification factor was  $3240 \pm 81$  and the mean yield was  $1.0 \pm 0.1\%$ . Molecular mass of mutacin B-Ny266 as determined by mass spectroscopy is  $2270.29 \pm 0.21$  Da. The amino acid sequence of the purified active fraction was obtained by Edman degradation after treatment with alkaline ethanethiol. Twenty-one amino acids were detected in this analysis. Mutacin B-Ny266 belongs to the type A lantibiotics. The proposed sequence is: F-K-A-W-U-F-A-Abu-P-G-A-A-K-O-G-A-F-N-U-Y-A. The molecule differs from that of epidermin/staphylococcin 1580 and gallidermin at positions 1, 2, 4, 5 and 6.

**Key words:** Mutacin; Bacteriocin; Lantibiotic; *Streptococcus mutans*; amino acid sequence

**Abbreviations:** Abu, 2-aminobutyric acid; ATCC, American Type Culture Collection; AU, Arbitrary units; BM-Lan,  $\beta$ -methyllanthionine; BMSEC,  $\beta$ -methyl-S-ethylcysteine; dhA or U, 2,3-didehydroalanine; dhB or O, (2)-2,3-didehydrobutyrine; DSER, PTH-dithiothreitol adduct of dhA; HPLC, high-pressure liquid chromatography; Lan, lanthionine; OPA, *o*-phthaldialdehyde; PTH, phenylthiohydantoin; RP-HPLC, reversed-phase high-pressure liquid chromatography; SEC, S-ethylcysteine; TFA, trifluoroacetic acid; TSAYE, trypticase soy agar yeast extract.

### 3.3. INTRODUCTION

Bacteriocins produced by Gram-positive bacteria can be defined as inhibitory substances having a bactericidal mode of action and an essential protein moiety [1]. Bacteriocins produced by *Streptococcus mutans* were termed mutacins by Hamada and Ooshima [2]. Although there are many reports which show that *S. mutans* produces inhibitory substances, only a few such inhibitors have been isolated and characterized as mutacins [3-13]. The well studied mutacins include: RM-10 [5], C3603 [13], JH 1000 [7], GS-5 [12], MT 3791 and MT 6223 [6,9], mutacin-b [4], mutalipocins [8] and J-T8 [3,10,11].

We previously published a preliminary classification of mutacins [14], but a definitive classification will have to await the complete chemical characterization of these substances. Among the known mutacins, only T8, which belongs to group J [14], was identified as a lantibiotic and its first 8 N-terminal amino acid residues were determined by Novák *et al.* [10]. Lantibiotics are defined as bacterium-derived ribosomally synthesized lanthionine-containing peptides with antibiotic activity [1,15,16]. They generally contain unsaturated amino acids like 2,3-didehydroalanine, and (2)-2,3-didehydrobutyrine. The lantibiotics are divided into two types [1,15-17]. Type A comprises screw-shaped, amphipathic molecules with molecular masses between 2151 and 4635 Da and with 2 to 7 net positive charges. Type B consists of more globular molecules with molecular masses between 1825 and 2042 Da and with either no net charge or a net negative charge.

In this paper, we present the results of the purification and the determination of the first complete sequence of a lantibiotic produced by *Streptococcus mutans*. Mutacin B-Ny266 was previously shown to inhibit 98% of the *S. mutans* strains tested [14] and all tested Gram-positive bacteria including *Listeria monocytogenes*, *Clostridium sporogenes*, *Mycobacterium phlei*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Bacillus subtilis* [18]. The mature peptide was purified to homogeneity and its amino acid sequence was determined.

### 3.4. MATERIAL AND METHODS

#### 3.4.1. MUTACIN PRODUCTION

Strain Ny266 of *Streptococcus mutans* was obtained from J. J. van der Hoeven (Dept. of Preventive Dentistry, University of Nijmegen, Nijmegen, The Netherlands). An overnight preculture in M17-lactose broth (BDH Inc., St-Laurent, QC, Canada) was used to inoculate 1 liter of M17 broth (1%) in 2-liter flasks. The cultures were incubated at 37°C under aerobic conditions in a standing incubator for 24 h.

#### 3.4.2. DETERMINATION OF INHIBITORY ACTIVITY

Trypticase Soy Agar (Difco Laboratories, Detroit, MI) plates enriched with 0.3% yeast extract were overlaid with 5 ml of melted TSAYE containing a standardized suspension (0.2 ml of an exponentially growing culture at an optical density of 0.1 at 600 nm) of *Micrococcus luteus* ATCC 272 (ATCC, Rockville, MD). In order to assess the activity of mutacin samples, two-fold dilutions were prepared in 0.11% TFA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) and 5 µl of each dilution deposited on top of the indicator plates. Mutacin activity was expressed in arbitrary units, which correspond to the reciprocal of the last dilution giving a clear inhibition zone against *M. luteus* after 24 h of incubation at 37°C under aerobic conditions [19].

The specific activity of each preparation was expressed in AU/mg protein. Protein concentrations were determined using the Bio-Rad DC protein assay (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada).

#### 3.4.3. MUTACIN EXTRACTION AND PURIFICATION

One liter of a 24-h culture of *S. mutans* Ny266 was centrifuged at 10,000 x g for 15 min and the mutacin was extracted from the cell pellet with a mixture of 20 ml HCl (20 mM) and 80 ml of ethanol (70%) at pH 2.0 (adjusted with HCl). The suspensions were heated at 70°C for 40 min, cooled on ice, and centrifuged at 10,000 x g for 15 min. This method was adapted from an extraction technique described by Hurst [20]. The supernatants were evaporated with a rotary evaporator at 37°C and the concentrates were applied to C<sub>18</sub> Sep-Pak® cartridges (Waters Corporation, Milford, MA) and eluted with a discontinuous gradient of acetonitrile

(12%, 18%, 24%, 30%, 33% and 60% acetonitrile in 0.1% TFA). Active fractions (30% and 33% acetonitrile) were then concentrated with a rotary evaporator and dried in a Speed-Vac® concentrator (Model SC110A, Savant Instruments Inc., Farmingdale, NY). The fractions were re-solubilized in 0.11% TFA. And further purified by RP-HPLC using an analytical C<sub>18</sub> column (Vitropack Lichrosorb RP 18, 5 µm; LKB, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). The chromatography was performed on an LKB system (Pharmacia) equipped with two pumps (model 2150), a controller (model 2152), a variable wavelength monitor (model 2151), a Rheodyne M7010 sample injection valve with a 20 µl loop, and a Hewlett-Packard 3396 integrator. Elution was carried out with solvent (A): 0.11% TFA and solvent (B): 60% acetonitrile in 0.1% TFA. The peptides were eluted with a linear gradient of acetonitrile over 44 min at a flow-rate of 1 ml/min and detected at 220 nm. The upper half of the peak showing activity (HPLC I) was concentrated in a Speed-Vac® and re-injected under the same conditions to yield fraction HPLC II and finally the pooled sample consisting of the upper third fraction of this peak from 8 different batches was injected under the same conditions to yield a unique peak (HPLC III) which was used for chemical analyses.

#### **3.4.4. POLARITY CALCULATION**

The polarity was calculated from the percentage of acetonitrile at which the substance eluted according to the formula given by Snyder [21].

#### **3.4.5. PURITY ASSESSMENT**

The purity of mutacin preparations was assessed by capillary electrophoresis. The samples were injected into a 44-cm capillary (2023 Fused silica capillary, 50 µm I.D.) by hydrodynamic injection on a capillary electrophoresis system (Thermo SP Separation Products, Toronto, ON, Canada). The separation was carried out at 25 kV in sodium phosphate buffer, pH 2.5 and 15% (V/V) acetonitrile, at 30°C. The detection was at 200 nm.

#### **3.4.6. MOLECULAR MASS DETERMINATION**

Molecular mass was determined from fraction HPLC III by electrospray mass spectroscopy on a VG/Fisons Quatro II electrospray triple quadrupole mass spectrometer



(Fison Instruments, Manchester, UK) at the Dept. of Chemistry, University of Waterloo, Waterloo, ON, Canada.

#### **3.4.7. AMINO ACID ANALYSIS**

Purified mutacin B-Ny266 (fraction HPLC III) was submitted to acid hydrolysis (HCl 6 N, 110°C, 21 h) and *o*-phthaldialdehyde (OPA) derivatization according to Sahl *et al.* [22]. The amino acids were analyzed by RP-HPLC chromatography on a Waters HPLC system (Waters Chromatography Division, Milford, MA) consisting of a Waters Radial-Pak C<sub>18</sub> 4- $\mu$ m column (8 mm x 10 cm) at 40°C, two pumps (Waters model 510) and an automatic injector (Waters Model 715). The OPA amino acid derivatives were detected at 425 nm (excitation wavelength 338 nm) on a fluorescence detector (Waters, Model 420). The sum of the Lan and/or BM-Lan residues was determined using D,L-lanthionine (Sigma) as a standard. The number of amino acid residues was calculated from the molar ratio relative to Ala and Asx.

#### **3.4.8. SEQUENCE DETERMINATION**

Automatic Edman degradation was performed on a Pulsad Liquid Protein sequencer (Applied Biosystems model 473, Foster City, CA) after ethanethiol treatment as described by Meyer *et al.* [23] to permit sequencing of lantibiotics. The results were interpreted according to Meyer *et al.* [23].

#### **3.4.9. PROTEIN SEQUENCE ACCESSION NUMBER**

The sequence of mutacin B-Ny266 has been deposited in the SWISS-PROT protein sequence database under accession number P80666.

### 3.5. RESULTS

The purification procedure was repeated 8 times. The mean cell yield of the cultures in M17 broth was  $0.79 \pm 0.04$  (mean  $\pm$  standard deviation) g of cell dry weight/L. The specific activity of the cell pellet extracts was  $115 \pm 43$  AU/mg of protein. The specific activity recovered from the supernatants was  $22 \pm 3$  AU/mg of protein. Therefore, only cell pellet extracts were further purified.

The mean values obtained from the 8 runs for the purification and yield for each step are presented in Table 3.1. Overall, mutacin B-Ny266 was purified  $3240 \pm 81$  fold with a yield of  $1.0 \pm 0.1\%$ , which correspond to  $3.4 \pm 0.3$   $\mu$ g per liter of culture. The substance was found to be more than 99.9% pure by capillary electrophoresis. As mutacin B-Ny266 elutes at 33.3% acetonitrile during RP-HPLC, its polarity was calculated to be 8.067.

The electrospray mass spectroscopy analysis yielded a molecular mass of  $2270.29 \pm 0.21$  Da for the purified mature peptide.

Taking into account the limits of amino acid analysis after acid hydrolysis and OPA derivatization, the amino acid content was determined by acid hydrolysis and Edman degradation and the results were consistent with both technics (Table 3.2). Forty percent of the residues are modified amino acids residues.

Edman degradation after treatment with alkaline ethanethiol revealed 21 residues with the following sequence:

$$F^1 - K^2 - (SEC+DSER)^3 - W^4 - SEC^5 - F^6 - (SEC+DSER)^7 - BMSEC^8 - P^9 - G^{10} - (SEC+DSER)^{11} - A^{12} - K^{13} - BMSEC^{14} - G^{15} - SEC^{16} - F^{17} - N^{18} - SEC^{19} - Y^{20} - SEC^{21}$$

The sample was sequenced with an initial yield of 1060 pmoles and a repetitive yield of 87.2%. The level of confidence was higher than 99%.

### 3.6. DISCUSSION

Mutacins have always been difficult to obtain from liquid cultures [2,18,24-26]. Novák *et al.* [10] recently obtained good production of mutacin J-T8 in a chemically defined medium enriched with yeast extract and trypticase soy broth. We obtained a good production of mutacin B-Ny266 in the commercially available medium M17 (BDH). Furthermore, we describe a simple technique permitting the extraction of the mutacin activity from cell pellets and we present, for the first time, the complete amino acid sequence of a mutacin.

Although the specific activity recovered from cell pellets was higher than that recovered from supernatants of bacterial cultures, the total amount of activity in the supernatants was calculated to be, on average, six times that of the cell extracts. Forty percent of this activity can be recovered but with a lower purity than from the cell extract (data not shown). We are presently working on a more efficient method to purify mutacin B-Ny266 from these supernatants, which would improve the total culture yields. Although the method of extraction presented permits the recovery of the active substance from cells, we observed a high variability from one extraction to another. Thus, the extraction and purification procedures have to be improved in order to increase the yield and reduce this variability. The procedure nevertheless permitted the purification of the lantibiotic B-Ny266 using only hydrophobicity chromatography. No impurities interfered with the determination of molecular mass and the amino acid sequencing. Furthermore, capillary electrophoresis indicated that the substance was more than 99.9% pure.

At our first sequencing attempt, Edman degradation was blocked at the first dhA (residue 5), the Trp4 was barely detectable, and a blank was obtained in the third position (preliminary results not shown). The ethanethiol treatment described by Meyer *et al.* [23] permitted the complete (except for residue 22) sequencing of the molecule. These results confirmed the conclusions of Meyer *et al.* [23] on the usefulness of this method for the automatic sequencing of lantibiotics.

The results obtained from amino acid analysis and Edman degradation are consistent (Table 3.2), taking into account the residues that could not be identified by amino acid analysis. DhA, dhB and Trp are acid labile and are not detected by acid hydrolysis and OPA derivatization [22,27], and Pro cannot be quantified by OPA derivatization.

According to Meyer *et al.* [23], the detection of a SEC signal (residues 5, 16, 19 and 21) during Edman degradation after ethanethiol treatment indicates the presence of a dhA residue. When this SEC signal is accompanied by a DSER signal (residues 3, 7, 11), it indicates the presence of a lanthionine residue. At cycles 16, 19 and 21, the DSER signal was not observed. These positions would correspond to a dhA residue. However, the DSER signal is always very low [23]. It is possible that, as cycles 16, 19 and 21 are at the end of the sequence, the corresponding DSER signal is undetectable. Furthermore, if we compare the molecule of B-Ny266 with closely similar substances such as epidermin (staphylococcin 1580) and gallidermin (Fig. 3.1), position 16-21 is occupied by a lanthionine. This would also be in accordance with the results of the amino acid analysis, in which we detected 3 Lan/BM-Lan (Table 3.2). We can thus hypothesized that these residues could be Lan 3-7, BM-Lan 8-11 and Lan 16-21. The SEC signal detected at position 19 indicates a dhA in the molecule. This dhA could well result from breakage of a link with the S-(2-aminovinyl)-D-cysteine residue, leaving a dhA in position 19 and S-(2-aminovinyl) in the terminal position (which was not detected in our sequence analysis). Although it was not detected, this C-terminal aminovinyl-cysteiny residue can be assumed from the comparison of the molecular masses obtained by mass spectroscopy analysis ( $2270.29 \pm 0.21$  Da) and the total mass obtained from the addition of all the residues calculated from the amino acid sequence (2196.55 Da) (Table 3.2). The difference between the two masses ( $73.74 \pm 0.21$  Da) agrees well with the molecular mass of a S-(2-aminovinyl) residue (73.12 Da). This assumption would again correspond to the known structures of epidermin and gallidermin (Fig. 3.1).

The signal corresponding to BMSEC indicate the presence of an Abu or a dhB [23]. We observed these signal for residues 8 and 14 during the sequencing. By analogy with the molecules of epidermin and gallidermin, we assigned Abu for residue 8 and dhB for residue 14.

If we hypothesize the same mode of posttranslational modification for mutacin B-Ny266 as for other lantibiotics [16,17], the pro-B-Ny266 would thus have the following sequence: F-K-S-W-S-F-C-T-P-G-C-A-K-T-G-S-F-N-S-Y-C-C. Cloning and sequencing the corresponding gene would confirmed the proposed primary structure.

According to the results presented, mutacin B-Ny266 differs from epidermin and gallidermin in positions 1, 2, 4, 5 and 6 and could thus be regarded as a type A lantibiotic (Fig. 3.1 and Table 3.3). It is surprizing that similar lantibiotics are produced by different bacterial genera. Epidermin and gallidermin are produced by staphylococci (*S. epidermidis* and *S. gallinarum*, respectively) while mutacin B-Ny266 is produce by a streptococci (*S. mutans* ). The Lan3-7, which is a common structure among group A lantibiotics [1], is also present in mutacin B-Ny266. The Lys2 is also found in subtilin and streptococcin (SA-FF22). The importance of this position for the characteristics of the molecule have not been studied so far. The sequence F1-K2-Lan3 can be found in inverted form as F5-K4-Lan3 in epidermin/staphylococcin 1580 and gallidermin. The significance of this observation eludes us for the moment, but it could point toward a common origin for these three lantibiotics.

Mutacin B-Ny266 possesses a dhA residue in position 5. This dhA5 was found to be important for the activity and stability of nisin [28], and for the sporicidal activity of nisin [29] and subtilin [30]. The possibility of a similar effect of the dhA5 residue in mutacin B-Ny266 activity would be well worth testing. Position 6 of epidermin and gallidermin seems to be implicated in antibacterial activity and resistance to trypsin [31]. While this position is occupied by I and L residues in epidermin and gallidermin, respectively, an F6 residue is found in mutacin B-Ny266, as for streptococcin A-FF22 [32; table 3.3]. Mutacin B-Ny266, epidermin, gallidermin and SA-FF22 must be compared with respect to their resistance to trypsin and their spectrum of action.

### **3.7. ACKNOWLEDGMENTS**

We thank the CNPq (Brasil) for supporting financially M. Mota-Meira, Lorne Taylor for the mass spectrometry analysis, Sylvie Bourassa from the Service de Séquence des Protéines de l'Est du Québec for the peptide sequencing, Dr Paul Nadeau from Agriculture et Agro-alimentaire Canada and Lise Lemieux for their collaboration with the amino acid analysis, Céline Paquin for her technical assistance and Yvette Robichaud and Carmen Bilodeau for typing the manuscript. This work was supported by the Fonds des chercheurs et de l'Avancement de la Recherche du Québec (FCAR, Équipe).

### 3.8. REFERENCES

- [1] Jack, R.W., Tagg, J.R. and Ray, B. (1995) *Microbiol. Rev.* 59, 171-200.
- [2] Hamada, S. and Ooshima, T. (1975) *Arch. Oral Biol.* 20, 641-648.
- [3] Chikindas, M.L., Novák, J., Driessen, A.J.M., Konings, W.N., Schilling, K.M. and Caufield, P.W. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 2656-2660.
- [4] Delisle, A.L. (1986) *Microbios* 46, 21-28.
- [5] Fukushima, H., Kelstrup, J., Fukushima, S., Umemoto, T., Kaibori, A. and Sagawa, H. (1985) *Arch. Oral Biol.* 30, 229-234.
- [6] Hamada, S., Imanishi, H. and Ooshima, T. (1986) *Zentralbl. Bakteriolog. Hyg. A.* 261, 287-298.
- [7] Hillman, J.D., Johnson, K.P. and Yaphe, B.I. (1984) *Infect. Immun.* 44, 141-144.
- [8] Kurita, T. and Hirasawa, M. (1988) *J. Gen. Microbiol.* 134, 213-220.
- [9] Loyola-Rodriguez, J.P., Morisaki, I., Kitamura, K. and Hamada, S. (1992) *J. Gen. Microbiol.* 138, 269-274.
- [10] Novák, J., Caufield, P.W. and Miller, E.J. (1994) *J. Bacteriol.* 176, 4316-4320.
- [11] Novák, J., Kirk, M., Caufield, P.W., Barnes, S., Morrisson, K. and Baker, J. (1996) *Anal. Biochem.* 236, 358-360.
- [12] Paul, D. and Slade, H.D. (1975) *Infect. Immun.* 12, 1375-1385.
- [13] Takada, K., Ikeda, T., Mitsui, I. and Shiota, T. (1984) *Infect. Immun.* 44, 370-378.
- [14] Morency, H., Trahan, L. and Lavoie, M.C. (1995) *Can. J. Microbiol.* 41, 826-831.
- [15] Bierbaum, G. and Sahl, H.-G. (1993) *Zentralbl. Bakteriolog.* 278, 1-22.
- [16] Jack, R.W. and Sahl, H.-G. (1995) *Trends Biotechnol.* 13, 269-278.
- [17] Jung, G. (1991) in: *Nisin and Novel Lantibiotics*. (Jung, G. and Sahl, H.-G. eds.) pp. 1-34. ESCOM Science, Leiden.
- [18] Parrot, M., Caufield, P.W. and Lavoie, M.C. (1990) *Can. J. Microbiol.* 36, 123-130.
- [19] Parrot, M., Charest, M. and Lavoie, M.C. (1989) *Can. J. Microbiol.* 35, 366-372.
- [20] Hurst, A. (1966) *J. Gen. Microbiol.* 45, 503-513.
- [21] Snyder, L.R. (1978) *Chromatogr. Sci.* 16, 223-234.

- [22] Sahl, H.-G., Grossgarten, M., Widger, W.R., Cramer, W.A. and Brandis, H. (1985) *Antimicrob. Agents Chemother.* 27, 836-840.
- [23] Meyer, H.E., Heber, M., Eisermann, B., Korte, H., Metzger, J.W. and Jung, G. (1994) *Anal. Biochem.* 223, 185-190.
- [24] Delisle, A.L. (1975) *Antimicrob. Agents Chemother.* 8, 707-712.
- [25] Kelstrup, J. and Funder-Nielsen, T.D. (1977) *J. Biol. Buccale* 5, 99-106.
- [26] Rogers, A.H. (1972) *Appl. Microbiol.* 24, 294-295.
- [27] Mulders, J.W.M., Boerrigter, I.J., Rollema, H.S., Siezen, R.J. and de Vos, W.M. (1991) *Eur. J. Biochem.* 201, 581-584.
- [28] Rollema, H.S., Kuipers, O.P., Both, P., de Vos, W.M. and Siezen, R.J. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2873-2878.
- [29] Chan, W.C., Dodd, H.M., Horn, N., Maclean, K., Lian, L.-Y., Bycroft, B.W., Gasson, M.J. and Roberts, G.C.K. (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2966-2969.
- [30] Liu, W. and Hansen, J.N. (1993) *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 648-651.
- [31] Ottenwälder, B., Kupke, T., Brecht, S., Gnau, V., Metzger, J., Jung, G. and Götz, F. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3894-3903.
- [32] Jack, R.W. and Tagg, J.R. (1991) in: *Nisin and Novel Lantibiotics*. (Jung, G. and Sahl, H.-G. eds.) pp. 171-179. ESCOM Science, Leiden.
- [33] Allgaier, H., Jung, G., Werner, R.G., Schneider, U. and Zähler, H. (1986) *Eur. J. Biochem.* 160, 9-22.
- [34] Sahl, H.-G. (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 752-755.
- [35] Kellner, R., Jung, G., Hörner, T., Zähler, H., Schnell, N., Entian, K.-D. and Götz, F. (1988) *Eur. J. Biochem.* 177, 53-59.
- [36] Gross, E. and Morell, J.L. (1971) *J. Am. Chem. Soc.* 93, 4634-4635.
- [37] Gross, E., Kiltz, H.H. and Nebelin, E. (1973) *Z. Physiol. Chem.* 354, 810-812.
- [38] Ross, K.F., Ronson, C.W. and Tagg, J.R. (1993) *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2014-2021.
- [39] Piard, J.-C., Kuipers, O.P., Rollema, H.S., Desmazeaud, M.J. and de Vos, W.M. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 16361-16368.
- [40] Rince, A., Dufour, A., Le Pogam, S., Thuault, D., Bourgeois, C.M. and Le Pennec, J.P. (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1652-1657.



- [41] Mørtvedt, C.I., Nissen-Meyer, J., Sletten, S. and Nes, I.F. (1991) *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1829-1834.
- [42] van de Kamp, M., Horstink, L.M., van den Hooven, H.W., Konings, R.N.H., Hilbers, C.W. Frey, A., Sahl, H.-G., Metzger, J.W. and van de Ven, F.J.M. (1995) *Eur. J. Biochem.* **227**, 757-771.

**Table 3.1. Mean yield of mutacin B-Ny266 for each purification step<sup>a</sup>**

Purification step	Purification factor	Yield (%)
Sep-Pak®	36 ± 27	31 ± 22
HPLC I	5 ± 3	22 ± 2
HPLC II	3 ± 1	49 ± 22
HPLC III	6	31
Total	3240 ± 81	1.0 ± 0.1

<sup>a</sup> Values presented are the mean ± standard deviation of eight purifications, except for the third HPLC chromatography, which was performed only once.

**Table 3.2. Amino acid composition of mutacin B-Ny266.**

Amino acid (one letter code)	Number of residues per molecule		
	Amino acid analysis <sup>a</sup> (Probable number of residues)	Edman degradation	Calculated molecular weight (Da)
Ala (A)	1.2 (1)	1	71.08
Asx (N, D)	0.8 (1)	1 (N)	114.10
Gly (G)	1.5 (1-2)	2	114.10
Lys (K)	2.5 (2-3)	2	256.35
Phe (F)	2.9 (3)	3	441.53
Tyr (Y)	0.7 (1)	1	163.18
Lan/BM-Lan <sup>b</sup>	2.7 (3)	3 (2 Lan + 1BM-Lan)	530.65
dhA (U)	0 <sup>c</sup>	2	138.13
dhB (O)	0 <sup>c</sup>	1	83.09
Pro (P)	NQ <sup>d</sup>	1	97.12
Trp (W)	0 <sup>c</sup>	1	186.21
			2195.54
		+ 1H (N-terminal)	1.01
			2196.55

<sup>a</sup> The number of amino acid residues was calculated from the molar ratio relative to Ala and Asx after OPA derivatization

<sup>b</sup> Lan = Lanthionine

BM-Lan =  $\beta$ -methyllanthionine

<sup>c</sup> dhA, dhB and Trp are acid labile and are not detected by the method used

<sup>d</sup> NQ, not quantified by OPA derivatization

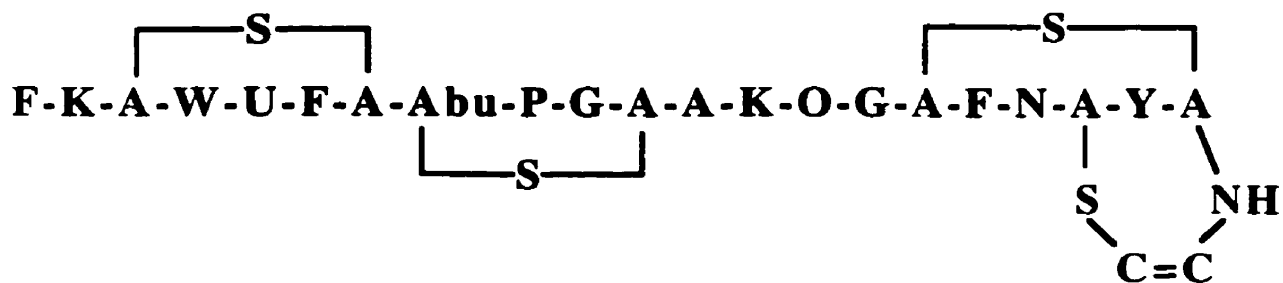
**Table 3.3. Comparison of the first 7 N-terminal amino acids of mutacin B-Ny266 with other known lantibiotics of group A.**

<u>Lantibiotics</u>	<u>N-terminal sequence<sup>a</sup></u>	<u>Reference</u>
	1    2    3    4    5    6    7	
Mutacin B-Ny266	F - K - A - W - U - F - A ...	This paper
Epidermin	I - A - A - K - F - I - A ...	[33]
Staphylococcin 1580	I - A - A - K - F - I - A ...	[34]
Gallidermin	I - A - A - K - F - L - A ...	[35]
Nisin A	I - O - A - I - U - L - A ...	[36]
Nisin Z	I - O - A - I - U - L - A ...	[27]
Subtilin	W - K - A - E - U - L - A ...	[37]
Salivaricin A	K - R - G - S - G - W - I ...	[38]
Streptococcin A-FF22	G - K - N - G - V - F - K ...	[32]
Lacticin 481	K - G - G - S - G - V - I ...	[39]
Lactococcin DR	K - G - G - S - G - V - I ...	[40]
Mutacin J-T8	N - R - W - W - Q - G - V ...	[10]
Lactocin S	S - T - P - V - L - A - S ...	[41]
Epilancin K7	X - A - U - V - L - K - O ...	[42]

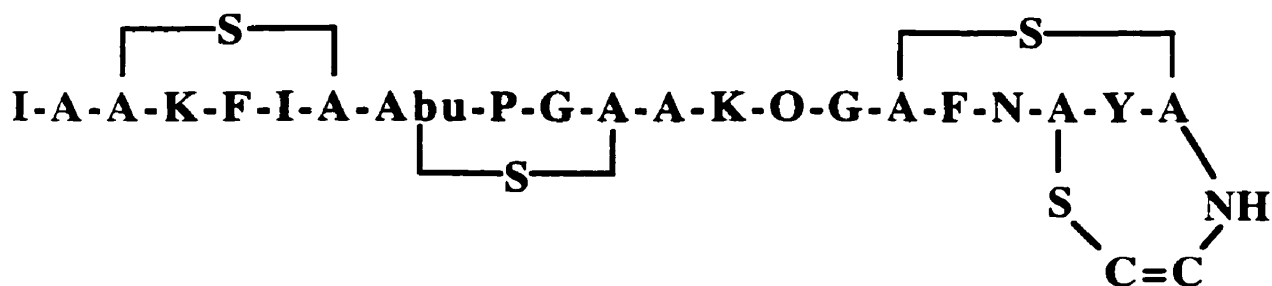
<sup>a</sup> Amino acids are identified by the one-letter code; U and O represent respectively 2,3-didehydroalanine and 2,3-didehydrobutyrine [42].

**Figure 3.1. Comparison of the proposed structure of mutacin B-Ny266 with those of epidermin (staphylococcin 1580) and gallidermin.**

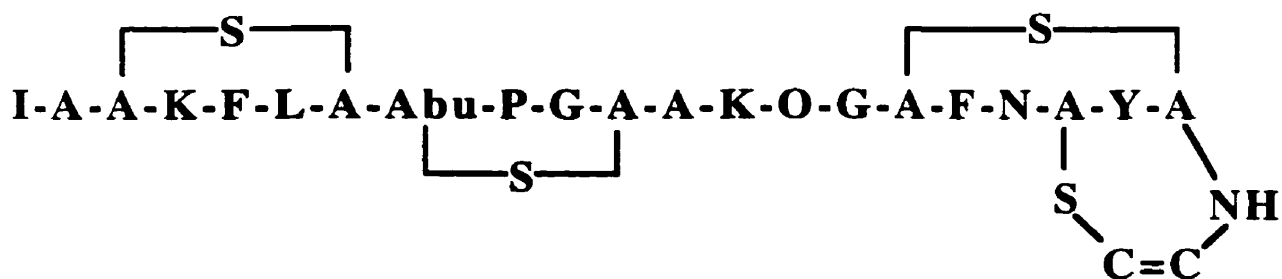
**MUTACIN B-Ny266**



**EPIDERMIN**  
(STAPHYLOCOCCIN 1580)



**GALLIDERMIN**



**CHAPITRE IV****MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATIONS OF MUTACIN B-NY266, NISIN A,  
VANCOMYCIN, AND OXACILLIN AGAINST BACTERIAL PATHOGENS**

**Marilaine Mota-Meira<sup>1</sup>, Gisèle LaPointe<sup>1</sup>, Christophe Lacroix<sup>1</sup> and  
Marc C. Lavoie<sup>2</sup>**

**Centre de recherche en sciences et technologie du lait (STELA), Faculté des sciences de  
l'agriculture et de l'alimentation<sup>1</sup>, and Département de biochimie et de microbiologie,  
Faculté des sciences et de génie<sup>2</sup>, Université Laval, Cité Universitaire, Québec, QC,  
Canada, G1K 7P4**

Soumis à « Antimicrobial Agents and Chemotherapy »

#### 4.1. RÉSUMÉ

Les peptides antimicrobiens, en particulier les lantibiotiques, sont de bons candidats pour remplacer les antibiotiques auxquels les bactéries sont devenues résistantes. Afin de comparer l'efficacité des lantibiotiques aux antibiotiques, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la nisine A, de la mutacine B-Ny266, de la vancomycine et de l'oxacilline ont été déterminées contre plusieurs souches bactériennes pathogènes. Les résultats indiquent que la nisine A et la mutacine B-Ny266 sont aussi actives que la vancomycine et l'oxacilline contre la majorité des souches testées (*Listeria* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Neisseria* sp., staphylocoques, streptocoques, entérocoques, peptostreptocoques, *Corynebacterium diphtheriae*, *Propionibacterium acnes*, *Actinomyces viscosus*, *Gardnerella vaginalis*, *Campylobacter jejuni* et *Helicobacter pylori*). Cependant, la mutacine B-Ny266 demeure active contre les souches qui sont résistantes à la nisine A, à l'oxacilline ou à la vancomycine. Le spectre d'activité de la mutacine B-Ny266, sa faible CMI contre les souches pathogènes, ainsi que son activité contre les souches résistantes aux autres substances antimicrobiennes testées rendent cette bactériocine très attrayante pour son développement comme agent thérapeutique.



## 4.2. ABSTRACT

Peptide antibiotics and particularly lantibiotics are good candidates to replace antibiotics to which bacteria have become resistant. In order to compare such lantibiotics with antibiotics, the minimum inhibitory concentrations (MIC) of nisin A, mutacin B-Ny266, vancomycin and oxacillin were determined against various bacterial pathogens. Nisin A and mutacin B-Ny266 are as active as vancomycin and oxacillin against most of the strains tested (*Listeria* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Neisseria* sp., staphylococci, streptococci, enterococci, peptostreptococci, *Corynebacterium diphtheriae*, *Propionibacterium acnes*, *Actinomyces viscosus*, *Gardnerella vaginalis*, *Campylobacter jejuni* et *Helicobacter pylori*). Furthermore, mutacin B-Ny266 remains active against the strains that are resistant to nisin A, oxacillin, or vancomycin. The wide activity spectrum of mutacin B-Ny266, its low MICs against bacterial pathogens, and its activity against bacteria resistant to other inhibitors, make this substance very attractive for its development for therapeutical applications.

### 4.3. INTRODUCTION

The discovery of antimicrobial agents has created a new era in medicine (2). The control of infectious diseases is now based on the choice and careful usage of a large group of low molecular weight inhibitors with diverse mechanisms of action and various spectra of antibacterial and antifungal activities (2). On the other hand, microorganisms have developed a variety of defense mechanisms against antibiotics (2, 28, 40, 49, 55). In past years, hundreds of tons of antimicrobial agents have been released on bacterial populations. However, they not only survived but even flourished in such hostile environment (2). Antibacterial drug resistance has been reported for most of the predominant pathogenic bacteria (5, 8, 28, 40, 43, 49). More recently, the problem of antimicrobial drug resistance was shown to be on the rise worldwide (4, 15, 29). New antimicrobial substances will thus have to be used in order to treat bacterial infections. Novel antibiotics will have to be sought permanently because of the capacity of microorganisms to survive their action. Many different strategies for finding new antimicrobial agents are currently proposed (14, 19, 43, 55, 59), among which the area of antibacterial peptides is under intense investigation (14, 19, 59). Among the most promising antibacterial peptides are bacteriocins (22), such as lantibiotics (24, 53). Bacteriocins are defined as proteinaceous bactericidal substances produced by bacteria (22). Some of these antimicrobial substances were found to contain unusual amino acids, lanthionines, and were thus classified as lantibiotics (21, 24, 39, 45, 53). These lantibiotics were further subdivided into two types (A and B) based on ring structure and primary sequence similarities in both the propeptide and, as far as the information is available, the leader peptide segments (24, 53). As lantibiotics are small peptides, it is possible to chemically or genetically modify their structures in order to increase or modify their already interesting properties (53).

Bacteriocins produced by *Streptococcus mutans* are termed mutacins (18). The mutacins produced by some strains were shown to be small peptides active against many Gram-positive bacteria (38, 47). Twenty-four different groups of mutacins were defined according to their activity spectra and their resistance to the other producing mutacinogenic strains (38). So far,

three mutacins (J-T8, B-Ny266, and 1140) were found to be lantibiotics (21, 39, 45). Mutacin B-Ny266 was purified, characterized, and found to be active against more than 98% of the Gram-positive bacteria tested (38, 47). This substance was identified as a type A lantibiotic having an amino acid sequence very similar to that of epidermin, gallidermin and mutacin 1140 (21, 39). Mutacin B-Ny266 inhibits many pathogens such as actinobacilli, bacilli, clostridia, corynebacteria, enterococci, listeriae, mycobacteria, neisseriae, staphylococci, and streptococci (38, 47).

The purpose of this study was to compare the efficiency of mutacin B-Ny266 to nisin and last generation of antibiotics (vancomycin and oxacillin) against various bacterial pathogens. The results indicate that mutacin B-Ny266 compares favorably to nisin A, vancomycin and oxacillin in inhibiting most of the Gram-positive and some Gram-negative bacterial pathogens. Furthermore, mutacin B-Ny266 is active against strains that are resistant to nisin, vancomycin, oxacillin, and other antibiotics.

#### **4.4. MATERIALS AND METHODS**

##### **4.4.1. BACTERIAL STRAINS, AND CULTURE CONDITIONS.**

Bacterial strains, growth media, temperature and conditions of incubation used in this study are presented in Table 4.1.

##### **4.4.2. ANTIMICROBIAL AGENTS**

Mutacin B-Ny266 was purified from the cell pellet of *Streptococcus mutans* strain Ny266 by ethanol extraction at pH 2.0 followed by reversed-phase chromatography on Sep-Pak® cartridge and by HPLC on a C<sub>18</sub> column, as previously described (39). Pure nisin A (Ambicin N®) was kindly provided by Aplin & Barrett Ltd (Beaminster, Dorset, UK), and vancomycin hydrochloride and oxacillin sodium salt monohydrate were obtained from Sigma (St-Louis, MO).

Stock solutions consisted of 0.8 mg/ml of pure mutacin B-Ny266 or 2.1 mg/ml of pure nisin A in sterile Clark and Lubs buffer (0.2 M KCl, 0.2 M HCl) at pH 2.0 (9); 3.2 mg/ml of

oxacillin or 3.0 mg/ml of vancomycin in sterile double-distilled water. The working solutions (five different concentrations for each antimicrobial substance) were dilutions of these stock solutions in sterile double-distilled water.

#### **4.4.3. DETERMINATION OF THE MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATIONS**

The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using a microplate assay, as previously described (48). The tested bacteria were grown to mid-log phase in appropriate medium at conditions given in Table 4.1. The optical density (OD) of the culture was adjusted with appropriate fresh medium at 0.1, using a Bausch and Lomb Spectronic 20 spectrophotometer (Bausch and Lomb Inc., Rochester, NY) at a wavelength of 610 nm. Two-fold dilutions of the working solutions of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin and oxacillin were prepared in microtiter plates (Falcon, Microtest III Tissue culture plates 3072, Becton Dickinson Laboratories, Franklin Lakes, NJ), the wells contained 100  $\mu$ l of the culture media. Twenty-five  $\mu$ l of the bacterial suspension were added to each well. The plates were incubated at the appropriate temperature, under the appropriate conditions and for the appropriate time according to the strain tested (Table 4.1). After incubation, which varied from one to five days depending on the strain tested (Table 4.1), the optical density was measured at 630 nm with a microplate reader (Model MR 5000/7000, Dynatech Laboratories Inc., Chantilly, VA). The positive growth control consisted of the tested strain in the same conditions without antibacterial substance and the blank was the medium alone. The MIC was calculated from the highest dilution showing complete inhibition of the tested strain ( $OD = OD_{\text{blank}}$ ). The MIC determinations were repeated at least three times, always including *Micrococcus luteus* ATCC 272 as the control.

#### **4.4.4. HEMOLYTIC ACTIVITY**

The hemolytic activity of mutacin B-Ny266 (16 to 64  $\mu$ g/ml), nisin A (21 to 84  $\mu$ g/ml), oxacillin (21 to 317  $\mu$ g/ml), and vancomycin (20  $\mu$ g/ml) were tested against defibrinated sheep red blood cells (Quelab, Montreal, QC, Canada) suspended in 0.2 M phosphate-buffered-saline (PBS) at pH 7.0, in flat bottom microtiter plates (Falcon). Twofold dilutions of nisin A and mutacin B-Ny266 were prepared in 0.2 M PBS (pH 7.0) in the wells, 25  $\mu$ l of blood were added and the plates were observed for hemolysis and read at 630 nm on a microplate reader

(Dynatech Laboratories Inc.). Double-distilled water was used as the hemolytic positive control, and 0.1 M and 0.2 M PBS (pH 7.0) were used as negative controls. The test was done in triplicate.

#### 4.4.5. ANTIBIOGRAMS

Antibiograms were performed on strains of neisseriae, enterococci, and staphylococci (Table 4.2) by the disk testing procedure M2-A4 according to the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (42). *Neisseria* sp. were tested on GC agar base (Difco) containing 1% supplement B (Difco), enterococci and staphylococci were tested on Mueller-Hinton agar (Difco) as described by the NCCLS (42). The antibiotic disks used were Sensi-Disc from BBL (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD): ampicillin (AM 10), bacitracin (B 10), cephalotin (CF 30), chloramphenicol (C 30), erythromycin (E 15), gentamicin (GM 10), kanamycin (K 30), lincomycin (L 2), nalidixic acid (NA 30), neomycin (N 30), oxacillin (OX 1), penicillin (P 10), polymyxin B (PB 300), rifampin (RA 5), streptomycin (S 10), sulfisoxazole (G 25), tetracycline (T 5), trimethoprim (TMP 5), vancomycin (VA 30). The results were interpreted according to the tables of the NCCLS (42) after 24 hours of incubation at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for neisseriae, and under aerobic conditions for the other organisms.

### 4.5. RESULTS

At the concentrations tested, none of the four antimicrobial substances tested showed hemolytic activity against sheep red blood cells.

Most of the clinical and mouse isolates tested demonstrated resistance to more than one antibiotic (Table 4.2). Bacitracin inhibited all the staphylococci, streptococci, and *Neisseria* strains tested. Only one strain was resistant to chloramphenicol (*S. haemolyticus* HL 2344), two were resistant to gentamicin (*E. faecalis* EF-Chul and HL 900), and three to rifampin (*E. faecalis* 2D4.22, HL 900, and *S. epidermidis* HL 1656) (Table 4.2). Cephalotin was very active against the strains of neisseriae and staphylococci, but slightly less towards enterococci, most of them being moderately susceptible to resistant. Four strains of *Neisseria* sp. and one

of enterococci were resistant to vancomycin. Oxacillin resistance was observed in nine strains of *Neisseria gonorrhoeae*, all (10) strains of enterococci, and eight strains of staphylococci.

Among *Micrococcus luteus* strains tested, *M. luteus* ATCC 272 showed the highest sensitivity towards mutacin B-Ny266 (MIC = 0.05 µg/ml) (Table 4.3), and was selected as indicator strain for determining mutacin activity with the microtitre assay. Mutacin B-Ny266 was generally more active than nisin A, vancomycin and oxacillin (except for the strain ATCC 9341) against all *Micrococcus luteus* strains tested (Table 4.3).

Mutacin B-Ny266 is slightly more effective than nisin A against enterococci, and less active than vancomycin and oxacillin (Table 4.4), except against strain 78.4, for which the activity of mutacin (MIC = 1.6 µg/ml) is comparable to that of vancomycin (MIC = 2.0 µg/ml). Mutacin B-Ny266 is the most active antimicrobial agent tested (MIC = 6.4 µg/ml) against the vancomycin-resistant strain EF-Chul and is active against oxacillin-resistant enterococci strains: 2L5.07, 78.4, EF-Chul, and HL 1148 (Table 4.4).

Against *Listeria* strains, the activity of mutacin B-Ny266 (MIC range: 0.4 to 2.0 µg/ml) is comparable to vancomycin (MIC range: 0.3 to 2.0 µg/ml), and both are generally more effective than oxacillin (MIC range: 0.5 to 15.9 µg/ml) and nisin A (MIC range: 1.1 to 16.7 µg/ml; Table 4.5).

Against staphylococci, the MIC of mutacin B-Ny266 was equal or lower than that of nisin A for all the tested strains (Table 4.6). It was also lower or equal to that of vancomycin except for one strain (R695) and it was lower or equal to that of oxacillin except for four strains (ATCC 25923 and 6538, D2.5 and ATCC 12228). Furthermore, mutacin B-Ny266 is still efficient against oxacillin-resistant (MIC 4 µg/ml) strains ( *S. aureus* ATCC 43300, R621, R629, R630, R678, R695, HL 1656, *S. epidermidis* HL 1656, HL 3176, and *S. haemolyticus* HL 2344; Tables 4.2 and 4.6).

The four antimicrobial substances are generally effective against the streptococci strains tested, nisin A is the least active (MIC range: 1.1 to 33.4 µg/ml) and oxacillin is the most active (MIC range: 0.02 to 1.1 µg/ml) of the four substances (Table 4.7).

Against spore-forming Gram-positive bacilli, the activity of mutacin B-Ny266 compared well with vancomycin, except for the strain *B. cereus* ATCC 2, and it is equal or more efficient than nisin A. The mutacin is also active against the oxacillin-resistant strain, *Bacillus cereus* ATCC 2 (Table 4.8).

The four antimicrobial substances are effective against the Gram-positive strict anaerobes tested, except for nisin A against *A. viscosus* Ny1 (Table 4.9). They are also active against *C. diphtheriae* and *G. vaginalis*, but are not very active against the strains of *M. smegmatis*, which are resistant to mutacin and oxacillin (Table 4.9).

The tested strains of *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni* (Table 4.10), and *Neisseria* spp (Table 4.11) were sensitive to mutacin B-Ny266 and nisin A. Mutacin B-Ny266 is more effective than oxacillin and vancomycin against *H. pylori* ATCC 43504 and as active as vancomycin against *C. jejuni*. Mutacin B-Ny266 was more efficient than nisin A against strains of *C. jejuni* and *H. pylori* tested (Table 4.10). The strain of *Haemophilus influenzae* is resistant to nisin A, vancomycin and oxacillin, and slightly less resistant to mutacin Ny266 (MIC: 12.8 µg/ml; Table 4.10). The strain of *Bordetella bronchiseptica* is the most resistant Gram-negative pathogen strain tested. Nevertheless, the MIC of mutacin B-Ny266 (49.2 µg/ml) against this strain was lower than that of nisin A, vancomycin and oxacillin (Table 4.10).

Clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* which are more resistant to vancomycin and oxacillin remain sensitive to mutacin B-Ny266 (MIC range: 0.8 to 6.4 µg/ml) and, to a lesser extent, to nisin A (MIC range: 4.2 to 16.7 µg/ml; Table 4.11).

In order to verify if the production of another lantibiotic could confer on the producing strain a cross-immunity towards mutacin B-Ny266 and nisin A, we tested the four antibiotics against several lantibiotic producing strains. While many of the tested strains were resistant to

nisin A, only *S. epidermidis* DSM 3095, producing epidermin, appeared less sensitive to mutacin B-Ny266 (Table 4.12).

Mutacin B-Ny266 was also active against nisin-resistant mutants obtained from *Pediococcus acidilactici* and *Listeria monocytogenes* (Table 4.13).

#### 4.6. DISCUSSION

In drug discovery, antimicrobial agents are first identified, tested to determine whether or not they have clinically relevant antimicrobial activity, tested for toxicity and finally for their ability to be delivered at the site of infection. Mutacin B-Ny266 was previously characterized (39) and is shown here to be active against many pathogens.

Vancomycin and oxacillin are presently used when other antibiotics have failed (13). However strains resistant to these antibiotics are beginning to appear (25, 28). The results presented in this paper indicate that mutacin B-Ny266 is generally as active as these two antibiotics and is active against strains that have become resistant to vancomycin and oxacillin. Mutacin B-Ny266 could thus be considered as a good candidate against infections caused by such antibiotic-resistant pathogens. Indeed, mutacin B-Ny266 inhibits most of the Gram-positive pathogens (enterococci, listeriae, staphylococci, streptococci, bacilli, clostridia, actinomyces, corynebacteria, peptostreptococci, propionibacteria) at low concentrations (< 4.0 µg/ml), except for the enterococci, where the median MICs range from 1.6 to 19.2 µg/ml.

Although many type A lantibiotics are known (22, 24, 53), to our knowledge, only nisin A is actually being clinically tested against several bacterial infections of the colon (11). As shown in this paper, mutacin B-Ny266 is more active than nisin A against *C. jejuni* and *H. pylori*, and is thus a good candidate for use in the treatment of peptic ulcers. Furthermore, it has not been possible to isolate stable mutacin B-Ny266 resistant mutants so far (M. K. Dagry, M.S. thesis, Université Laval, Québec, QC, Canada, 1996), while nisin-resistant mutants are



easily obtained (7, 17, 31, 34, 35, 37, 54, 60). In addition, the nisin-resistant strains tested in this study were sensitive to mutacin B-Ny266.

Enterococci are frequently associated with intra-abdominal wound infections, urinary infections, bacterial endocarditis and bacteremia (12). One of the most important, and often overlooked characteristic of the enterococci, is that they are not killed by any single currently available antimicrobial agent at clinically attainable serum and tissue levels (13). A combination of penicillin and aminoglycoside is usually used, and penicillin is replaced by vancomycin in the case of penicillin resistance for the treatment of serious enterococcal infections (13). Some enterococci strains have, however, acquired plasmid-mediated resistance to vancomycin (28) and penicillin (40), which seriously compromises the efficacy of the antibiotic treatment of serious enterococcal infections (13). Our data confirm that enterococci are generally resistant to oxacillin (30). Although the strains of enterococci tested here were generally more sensitive to vancomycin than to mutacin B-Ny266, the vancomycin-resistant isolate (EF-Chul) was sensitive to mutacin B-Ny266. This is a good example of the possible use of mutacin B-Ny266 against serious vancomycin-resistant enterococcal infections.

Listeriosis is mostly of food-borne origin (16). However, *L. monocytogenes* can cause meningitis, encephalitis and septicemia (56). In pregnant women, *L. monocytogenes* infections may result in abortion, stillbirth or premature birth of an infected infant (56). *In vitro*, *Listeria* sp. is susceptible to the antibiotics currently in use. However, plasmids conferring resistance to chloramphenicol, macrolides, and tetracyclines have been found in several clinical isolates of *L. monocytogenes* and have raised serious health concerns (56). As shown in the present paper, mutacin B-Ny266 is more effective than nisin A against all strains of *Listeria* sp. tested and could thus eventually be used like nisin as a food preservative.

Staphylococci frequently cause infections and *S. aureus* is considered the most important human pathogen of this group. *S. aureus* is responsible for many skin infections, endocarditis, bacteremia and a variety of toxin-mediated diseases including gastroenteritis, staphylococcal scale-skin syndrome and toxic shock syndrome (25). Antibiotic-resistant strains of staphylococci represent a major clinical and epidemiological problem in hospitals, even more since the apparition of methicillin-resistant strains (25). We observed in this study that

mutacin B-Ny266 is active against multi-drug resistant strains of *S. aureus*, and particularly against oxacillin-resistant strains. Mutacin B-Ny266 thus appears a good candidate to control problematic staphylococci in hospital environments.

Group A streptococci (*S. pyogenes*) are the most common cause of pharyngitis in children of 5 to 10 years of age (52). They produce a wide array of serious infections, including pharyngitis, respiratory infection, skin and soft tissue infections, endocarditis, meningitis, puerperal sepsis, and arthritis. They may produce scarlet fever, acute rheumatic fever and glomerulonephritis, and could be responsible for toxic shock-like syndrome (13, 52). Group C streptococci may cause epidemic food-borne pharyngitis and acute glomerulonephritis (13). Epidemic pharyngitis have also been associated with group G streptococci (13, 52). Groups C and G streptococci are more frequently recognized as the cause of bacteremia, endocarditis, meningitis, pneumonitis, bone and joint infections, soft tissue infection and, in the case of group G puerperal sepsis (13, 52). Group B streptococci (*S. agalactiae*) are most notable for their role in causing neonatal sepsis and meningitis (13, 52). *S. pneumoniae* is the leading cause of pneumonia and a frequent cause of otitis media, sinusitis and meningitis (52). Viridans streptococci (including *S. mutans*) are primarily associated with dental caries and infective endocarditis, while *S. bovis* has been associated with bacteremia, gastro-intestinal lesions, and meningitis (13, 52). Finally, *S. agalactiae*, *S. uberis*, *S. suis*, and *S. saprophyticus* are implicated more often in animal diseases, but can also infect humans (1). Most pneumococci remain susceptible to penicillin and the penicillin-resistant strains are uniformly susceptible to vancomycin (13, 52). Penicillin resistance is on the rise among streptococci, but most strains are still susceptible to vancomycin (52). The activity of mutacin B-Ny266 against all streptococci tested in this study is similar to that of vancomycin. Thus mutacin B-Ny266 may constitute a good potential candidate in the case of appearance of vancomycin-resistant strains.

The majority of *Bacillus* species apparently have little or no pathogenic potential and are rarely associated with diseases in humans. However, *B. cereus* has been incriminated in food poisoning and in other human and animal infections (58). Among other bacilli, *B. coagulans* has been associated with bacteremia and septicemia; and *B. subtilis* with bacteremia, septicemia, endocarditis and respiratory infections (58). Since bacilli are generally susceptible

to most of the antibiotics in use, mutacin B-Ny266 only adds another possibility if resistant strains appear. Our data indicate that *B. cereus* ATCC 2 is resistant to oxacillin, but remains susceptible to mutacin B-Ny266.

Clostridia may cause exogenous and endogenous diseases. Exogenous infections include botulism, *C. perfringens* food-borne illness, gas gangrene associated with traumatic wounds and tetanus. Endogenous infections involving clostridia of the indigenous flora are much more common (46). However, multiple-drug resistant strains are rarely observed among clostridia (46). As discussed for *Listeria*, mutacin B-Ny266 could be used like nisin A to prevent the growth of clostridia in food.

Peptostreptococci are etiological agents of postpartum endometritis, associated with preterm birth, head and neck infections, periodontitis, chronic otitis media, chronic sinusitis and brain abscess (20). Most isolates of *Peptostreptococcus* are susceptible to beta-lactams and most cephalosporin-type antibiotics (20). However, there is evidence for macrolide-lincosamide resistance among the species (49). So, although mutacin B-Ny266 was found to be as active as vancomycin and oxacillin against the two strains tested here, there is no urgent need for a new antibiotic against this species for the moment.

Actinomycosis is the most frequently encountered disease involving *Actinomyces* spp., which may also be responsible for pelvic inflammatory disease associated with intrauterine devices (20). The role of *Propionibacterium acnes* in acne vulgaris is largely accepted (20). It is also generally accepted that anaerobic gram-positive non-sporeforming rods (including *Actinomyces* spp. and *Propionibacterium* spp.) are susceptible to penicillin G, carbenicillin and chloramphenicol (20). The activity of mutacin B-Ny266 is similar to vancomycin and oxacillin against these species. Although there is no urgent need for new antibiotics against these pathogens, mutacin B-Ny266 can be considered as a potential alternative.

The most common disease caused by *C. diphtheriae* is diphtheria, manifested by both local infection of the upper respiratory tract and the systemic effects of a toxin which are most notable in the heart and peripheral nerves, and cutaneous diphtheria (6). It has also been associated with endocarditis (6). The best preventive action against diphtheria is vaccination. Penicillin or erythromycin are recommended to kill *C. diphtheriae*, but some resistance to

erythromycin has been observed (6). Most strains are still susceptible to vancomycin (6). *Gardnerella vaginalis* is one of several species associated with bacterial vaginosis, it can causing fatal and non-fatal septicemia as well as umbilical and fetal scalp monitor infections in neonates (6). Ampicillin and amoxicillin are the drugs of choice for infections with pure cultures of *G. vaginalis*; no beta-lactamases have been reported in this species (6). Although these species were found to be sensitive to mutacin B-Ny266, the problem of multi-drug resistance has not yet been observed in these species, and thus the need for a new antibiotic remains low.

*Mycobacterium smegmatis* has often been associated with soft tissue lesions following trauma or surgery (44, 61). Although this species rarely causes human disease, it was chosen as a model for pathogenic *Mycobacterium tuberculosis*. Drug resistance in the latter species has become a serious concern (44). Unfortunately, *M. smegmatis* was found to be resistant to the four antibiotics used here.

Although antibiotics are not usually active against most Gram-negative bacteria (24, 53), nisin was found to be active against *Neisseria* sp. (33) and *H. pylori* (11). In a previous study (47), preliminary tests showed that most Gram-negative bacteria were resistant to mutacin B-Ny266, except *Neisseria subflava* and *Flavobacterium capsulatum*. In this study, the list of Gram-negative pathogens that are susceptible to mutacin B-Ny266 has been extended.

*Bordetella bronchiseptica* causes infectious tracheobronchitis in dogs and can be used as a model for the human pathogen *B. pertussis*. *B. bronchiseptica* is also a opportunistic pathogen of humans, associated with both respiratory tract infections and non respiratory infections (32). Erythromycin is the drug of choice for both treatment and prophylaxis against *Bordetella* sp., and no *in vitro* resistance has been detected (32). None of the antibiotics tested here was active against *B. bronchiseptica*.

*Campylobacter jejuni* is established as one of the most common causes of sporadic bacterial enteritis in the United States and it may be orders of magnitude higher in developing countries (41). Although most antibiotics are still very active against this species, resistance to ciproflaxacin and fluoro-quinolones has been reported (41), the results presented here indicate that mutacin B-Ny266 could be used to combat *C. jejuni* when more resistant strains appear.

*Helicobacter pylori* has been strongly associated with peptic ulceration and gastric cancer (23). Triple (bismuth, tetracycline or amoxicillin, metronidazole) and quadruple (bismuth, tetracycline, metronidazole, omeperazole) therapies are recommended for treating *H. pylori* infection, but the efficiency of these treatments has decreased with the emergence of metronidazole-resistant strains (23). Certain antimicrobial agents like clindamycin and erythromycin are inactivated in the acidic environment of the stomach (23). In contrast, lantibiotics such as nisin are very resistant to acid pH (11) and are thus good candidates as potential antibacterials of choice against *H. pylori*. Indeed, nisin A (Ambicin N®) is currently being tested for this application (11). We found that mutacin B-Ny266 is slightly more active than nisin A, vancomycin and oxacillin to combat *H. pylori*. Furthermore, as mutants resistant to nisin, vancomycin and oxacillin are still sensitive to mutacin B-Ny266, as shown in this paper, it could be a good replacement in case *H. pylori* strains develop resistance against these antibiotics.

A wide variety of *Haemophilus* infections may occur in humans, ranging from infections that are frequent and easily manageable (conjunctivitis and otitis media) to those that are rare and potentially life threatening (meningitis, pericarditis and Brazilian purpuril fever) (3). *H. influenzae* has developed resistance to many antibiotics (3), which justifies the search for new therapeutic agents. Mutacin B-Ny266 is at least five times more active against *H. influenzae* than nisin A, oxacillin and vancomycin, indicating that mutacin B-Ny266 is a good candidate for use to fight *Haemophilus* infections.

Gonorrhoea caused by *Neisseria gonorrhoeae* remains the most frequently reported communicable disease in the United States (26). *N. meningitidis* may cause meningococemia and/or meningitis (26). Antimicrobial resistance is now widespread among strains of *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis* (5, 26). Mutacin B-Ny266 and nisin A remain active against vancomycin- and oxacillin-resistant strains of *Neisseria*, which makes them good candidates against these infections.

We observed that multi-drug resistant pathogens were sensitive to nisin A, in agreement with the data reported by Severina *et al.* (54), and they were even more sensitive to mutacin B-Ny266.

As antibiotic-resistance genes may originate from the antibiotic producing strain, we tested the resistance of known mutacin or lantibiotic producing strains for their sensitivity to mutacin B-Ny266 and nisin A. Although we cannot be certain for the moment that an immunity gene is implicated, most of the lantibiotic (nisin A, nisin Z, epidermin, mutacins 1140 and B-Ny266) producing strains are resistant to nisin A and other pediocin producing strains resistant to nisin. This resistance could eventually spread among bacterial populations and impair the efficiency of nisin as an antibiotic. The producing strain (*Streptococcus mutans* Ny266) is about ten times more resistant to its own lantibiotic than the *S. mutans* type strains. It is, however susceptible to 5 µg/ml of mutacin B-Ny266 which slightly alleviates the problem. *Staphylococcus epidermidis* DSM 3095, which produces epidermin, is about sixteen and forty fold more resistant to mutacin B-Ny266 and nisin A, respectively, than the *Staphylococcus epidermidis* type strain (ATCC 12228). If this resistance gene eventually spreads among bacterial pathogens, it would impair the efficiency of both mutacin B-Ny266 and nisin. However, more studies are needed to evaluate the real threat of the dissemination of lantibiotic resistance genes.

The wide activity spectrum of mutacin B-Ny266, the fact that it is active against antibiotic-resistant strains and nisin-resistant mutants, and that no stable mutants resistant to mutacin B-Ny266 could be obtained (Dagry, M.S. thesis) are all factors supporting the development of mutacin B-Ny266 as a clinical antibiotic. Studies are now needed to assess its toxicity and its ability to be delivered at the site of infection.

#### **4.7. ACKNOWLEDGMENTS**

We thank the CNPq (Brazil) for supporting M. Mota-Meira; Drs. H. W. Ackerman, M. G. Bergeron, M. Boissinot, G. Brochu, I. Castro, A. Delisle, M. S. Diarra, S. Fujimura, D. Grenier, J. H. Hillman, M. Jacques, T. Kurita, J. Lapointe, J. S. Van der Hoeven for providing bacterial strains. This work was supported by the Fonds pour les Chercheurs et de l'Avancement de la Recherche of the Province of Québec (Fonds FCAR – Research Team).

#### 4.8. REFERENCES

1. **Arends, J. P., and H. C. Zanem.** 1988. Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. *Rev. Infect. Dis.* **10**:131-136.
2. **Bryan, L. E. (ed.).** 1984. Antimicrobial drug resistance, Academic Press, Inc., Orlando, FL.
3. **Campos, J. M.** 1995. *Haemophilus*, p. 556-565. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
4. **Cassell, G. H.** 1995. ASM task force urges broad program on antimicrobial resistance. *ASM News* **61**:116-120.
5. **Castro, I., M. G. Bergeron, and S. Chamberland.** 1993. Characterization of multiresistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Nicaragua. *Sex. Transm. Dis.* **20**:314-320.
6. **Clarridge, J. E., and C. A. Spiegel.** 1995. *Corynebacterium* and miscellaneous irregular Gram-positive rods, *Erysipelothrix*, and *Gardnerella*, p. 357-378. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
7. **Crandall, A. D., and T. J. Montville.** 1998. Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:231-237.
8. **Davies, J.** 1996. Bacteria on the rampage. *Nature (London)* **383**:219-221.
9. **Dawson, R. M. C., D. C. Elliott, W. H. Elliott, and K. M. Jones (ed.).** 1969. Data for biochemical research: pH and buffers p. 475-508, 2nd ed. Oxford University Press, London, U.K.

10. **Delisle, A. L.** 1986. Properties of mutacin b, an antibacterial substance produced by *Streptococcus mutans* strain BHT. *Microbios* **46**:21-28.
11. **Delves-Broughton, J., P. Blackburn, R. J. Evans, and J. Hugenholtz.** 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. *Ant. Leeuwenhoek* **69**:193-202.
12. **Facklam, R. R., and D. F. Sahn.** 1995. *Enterococcus*, p. 308-314. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
13. **Facklam, R. R., and J. A. Washington II.** 1991. *Streptococcus* and related catalase-negative Gram-positive cocci, p. 238-257. In A. Ballows, W. J. Hausler, Jr., K. L. Herrmann, H. D. Isenberg, H. J. Shadomy (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
14. **Fernandes, P. B.** 1995. Pharmaceutical perspective on the development of drugs to the treat infectious diseases. *ASM News* **62**:21-24.
15. **Fox, J.** 1997. Antibiotic resistance on rise globally. *ASM News* **63**:655-655.
16. **Gellin, B. G., and C. V. Broome.** 1989. Listeriosis. *J. Am. Med. Assoc.* **261**:1313-1320.
17. **Goulhen, F., J. Meghrous, and C. Lacroix.** 1998. Characterization of nisin-resistant variants of *Pediococcus acidilactici* UL5, a producer of pediocin. *J. Appl. Microbiol.* **85**:387-397.
18. **Hamada, S., and T. Ooshima.** 1975. Production and properties of bacteriocins (mutacins) from *Streptococcus mutans*. *Archs. Oral Biol.* **20**:641-648.
19. **Hancock, R. E. W.** 1997. Peptide antibiotics. *Lancet* **349**:418-422.
20. **Hillier, S. H., and B. J. Moncla.** 1995. *Peptostreptococcus, Propionibacterium, Eubacterium*, and other nonsporeforming anaerobic Gram-positive bacteria, p. 587-602. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology,



Washington, D.C.

21. **Hillman, J. D., J. Novak, E. Sagura, J. A. Gutierrez, T. A. Brooks, P. J. Crowley, M. Hess, A. Azizi, K. P. Leung, D. Cvitkovitch, and A. S. Bleiweis.** 1998. Genetic and biochemical analysis of mutacin 1140, a lantibiotic from *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* **66**:2743-2749.
22. **Jack, R. W., J. R. Tagg, and B. Ray.** 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* **59**:171-200.
23. **Jerris, R. C.** 1995. *Helicobacter*, p. 492-498. *In* P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
24. **Jung, G.** 1991. Lantibiotics - Ribosomally synthesized biologically active polypeptides containing sulfide bridges and  $\alpha$ - $\beta$ -didehydroamino acids. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **30**:1051-1192.
25. **Kloos, W. E., and T. L. Bannerman.** 1995. *Staphylococcus* and *Micrococcus*, p. 282-298. *In* P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
26. **Knapp, J. S., and R. J. Rice.** 1995. *Neisseria* and *Branhamella*, p. 324-340. *In* P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
27. **Kurita, T., and M. Hirasawa.** 1988. Biological and biochemical characterization of novel lipid-like antibacterial substances (mutalipocins) produced by *Streptococcus mutans* strains 32K. *J. Gen. Microbiol.* **134**:213-320.
28. **Leclerc, R., E. Derlot, J. Duval, and P. Courvalin.** 1988. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N. Engl. J. Med.* **319**:157-161.

29. **Levy, S., and A. Salyers.** 1998. New network to monitor antibiotic resistance gene trends. *ASM News* **64**:124-124.
30. **Lorian, V. (ed.).** 1991. *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 3th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
31. **Maisnier-Patin, S., and J. Richard.** 1996. Cell-wall changes in nisin-resistant variants of *Listeria innocua* grown in the presence of high nisin concentration. *FEMS Microbiol. Lett.* **140**:29-35.
32. **Marcon, M. J.** 1995. *Bordetella*, p. 566-573. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
33. **Mattick, A. T. R., and A. Hirsch.** 1947. Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. *Lancet* **2**:5-7.
34. **Mazzotta, A. S., A. D. Crandall, and T. J. Montville.** 1997. Nisin resistance in *Clostridium botulinum* spores and vegetative cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2654-2659.
35. **Mazzotta, A. S., and T. J. Montville.** 1997. Nisin induces changes in membrane fatty acid composition of *Listeria monocytogenes* nisin-resistant strains at 10° C and 30° C. *J. Appl. Microbiol.* **82**:32-38.
36. **Meghrous, J., C. Lacroix, M. Bouksaïm, G. LaPointe, and R. E. Simard.** 1997. Genetic and biochemical characterization of nisin Z produced by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* UL 719. *J. Appl. Microbiol.* **83**:133-138.
37. **Ming, X., and M. A. Daeschel.** 1993. Nisin resistance of foodborne bacteria and the specific resistance responses of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Food Protect.* **56**:944-948.
38. **Morency, H., L. Trahan, and M. C. Lavoie.** 1995. Preliminary grouping of mutacins. *Can. J. Microbiol.* **41**:826-831.

39. **Mota-Meira, M., G. LaPointe, C. Lacroix, and M. C. Lavoie.** 1997. Purification and structure of mutacin B-Ny266: a new lantibiotic produced by *Streptococcus mutans*. *FEBS Lett.* **410**:275-279.
40. **Murray, B. E., and B. Mederski-Samaroj.** 1983. Transferable  $\beta$ -lactamase: a new mechanism for in vitro penicillin resistance in *Streptococcus faecalis*. *J. Clin. Invest.* **72**:1168-1171.
41. **Nachamkin, I.** 1995. *Campylobacter* and *Arcobacter*, p. 483-491. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
42. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 1991. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, vol. 10, no. 7, 4th ed. Approved Standard M2-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA.
43. **Neu, H.** 1992. The crisis in antibiotic resistance. *Science* **257**:1064-1072.
44. **Nolte, F. S., and B. Metchok.** 1995. *Mycobacterium*, p. 400-437. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
45. **Novak, J., P. W. Caufield, and E. J. Miller.** 1994. Isolation and biochemical characterization of a novel lantibiotic mutacin from *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **176**:4316-4320.
46. **Onderdonk, A. B., and S. D. Allen.** 1995. *Clostridium*, p. 574-586. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
47. **Parrot, M., P. W. Caufield, and M. C. Lavoie.** 1990. Preliminary characterization of four bacteriocins from *Streptococcus mutans*. *Can. J. Microbiol.* **36**:123-130.
48. **Parrot, M., M. Charest, and M. C. Lavoie.** 1989. Production of mutacin-like substances by *Streptococcus mutans*. *Can. J. Microbiol.* **35**:366-372.

49. **Reig, M., A. Moreno, and F. Baquero.** 1992. Resistance of *Peptostreptococcus* ssp. to macrolides and lincosamides: inducible and constitutive phenotypes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:662-664.
50. **Rodrigue, L., and M. C. Lavoie.** 1996. Distribution of the resident oral microbiota of BALB/c mice from different suppliers. *Lab. Anim.* **30**:108-113.
51. **Rodrigue, L., M. J. Barras, H. Marcotte, and M. C. Lavoie.** 1993. Bacterial colonization of the oral cavity of BALB/c mouse. *Microbial Ecol.* **26**:267-275.
52. **Ruoff, K. L.** 1995. *Streptococcus*, p. 299-307. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
53. **Sahl, H.-G., and G. Bierbaum.** 1998. Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**: 41-79.
54. **Severina, E., A. Severin, and A. Tomasz.** 1998. Antibacterial efficacy of nisin against multidrug-resistant Gram-positive pathogens. *J. Antimicrob. Chemother.* **41**:341-347.
55. **Silver, L. L., and K. A. Bostian.** 1993. Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:377-383.
56. **Swaminathan, B., J. Rocourt, and J. Bille.** 1995. *Listeria*, p. 341-348. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
57. **Trudel, L., L. St-Amand, M. Bareil, P. Cardinal, and M. C. Lavoie.** 1986. Bacteriology of the oral cavity of BALB/c mice. *Can. J. Microbiol.* **32**:673- 678.
58. **Turnbull, P. C. B., and J. M. Kramer.** 1995. *Bacillus*, p. 349-356. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

59. **Tytler, E. M., G. M. Anantharamaiah, D. E. Walker, V. K. Mishra, M. N. Palgunachari, and J. P. Segrest.** 1995. Molecular basis for prokaryotic specificity of magainin-induced lysis. *Biochemistry* **34**:4393-4401.
60. **Verheul, A., N. J. Russell, R. van'T. Hof, F. M. Rombouts, and T. Abee.** 1997. Modifications of membrane phospholipid composition in nisin-resistant *Listeria monocytogenes* Scott A. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3451-3457.
61. **Wallace, R. J., Jr., D. R. Nash, M. Tsukamur, Z. M. Blacklock, and V. A. Silcox.** 1988. Human disease due to *Mycobacterium smegmatis*. *J. Infect. Dis.* **158**:52-59.

**Table 4.1. Bacterial strains and test conditions.**

Indicator species	Strain	Source <sup>a</sup>	Test conditions <sup>b</sup>				
			Number of repetitions	Media	Temp. (°C)	Atmosphere	Time (d)
<i>Actinomyces viscosus</i>	Ny1	Van der Hoeven	5	BHI	37	Ana	1
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 2	ATCC	8	TSBYE	37	Air	1
<i>B. coagulans</i>	ATCC 7050	ATCC	5	TSBYE	37	Air	1
<i>B. stearothermophilus</i>	ATCC 7953	ATCC	3	TSBYE	55	Air	1
<i>B. subtilis</i>	ATCC 6633	ATCC	4	TSBYE	37	Air	1
<i>B. subtilis</i>	168T	Lapointe	4	TSBYE	37	Air	1
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	LSPQ 2021	LSPQ	4	BHI	37	Ana	1
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 29428	ATCC	6	BHI	37	CO <sub>2</sub>	3
<i>Clostridium bifermentans</i>	2D1.04	Trudel et al. (57)	5	TSBYE	37	Ana	1
<i>C. butyricum</i>	ATCC 860	ATCC	6	TSBYE	37	Ana	1
<i>C. perfringens</i>	ATCC 3628	ATCC	3	TSBYE	37	Ana	3
<i>C. sporogenes</i>	ATCC 19404	ATCC	9	TSBYE	37	Ana	3
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	LSPQ 3076	LSPQ	3	BHI	37	Air	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 27275	ATCC	4	TSBYE	37	Air	1
<i>E. faecalis</i>	EF-Chul	CHUL	8	TSBYE	37	Air	1
<i>E. faecalis</i>	HL 900, HL 1148	HL	5, 7	TSBYE	37	Air	1
<i>E. faecalis</i>	2D4.22, 2L5.07, 78.4, D2.20, L2.4, M2.01, S1.17	Trudel et al. (57)	6, 7, 3, 3, 4, 4, 3	TSBYE	37	Air	1
<i>E. hirae</i>	ATCC 8043	ATCC	4	TSBYE	37	Air	1

**Table 4.1. Bacterial strains and test conditions (continued)**

Indicator species	Strain	Source <sup>a</sup>	Test conditions <sup>b</sup>				
			Number of repetitions	Media	Temp. (°C)	Atmosphere	Time (d)
<i>Gardnerella vaginalis</i>	ATCC 14018	ATCC	4	BHI	37	CO <sub>2</sub>	1
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 8142	ATCC	4	BHI + B	37	CO <sub>2</sub>	1
<i>Helicobacter pylori</i>	ATCC 43504	ATCC	3	BHI + FBS	37	CO <sub>2</sub>	3
<i>H. pylori</i>	NCTC 11638	NCTC	3	BHI + FBS	37	CO <sub>2</sub>	5
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	ATCC 11454	ATCC	4	TSBYE	37	Air	1
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	UL719	Meghroun et al. (36)		TSBYE	37	Air	1
<i>Listeria grayi</i>	ATCC 19120	ATCC	5	TSBYE	37	Air	1
<i>L. grayi</i>	HPB 29	HPB	3	TSBYE	37	Air	1
<i>L. innocua</i>	ATCC 33090	ATCC	5	TSBYE	37	Air	1
<i>L. innocua</i>	HPB 13	HPB	3	TSBYE	37	Air	1
<i>L. ivanovii</i>	ATCC 19119	ATCC	3	TSBYE	37	Air	1
<i>L. ivanovii</i>	HPB 28	HPB	5	TSBYE	37	Air	1
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 15313	ATCC	5	TSBYE	37	Air	1
<i>L. monocytogenes</i>	FRDC 1089	FRDC	5	TSBYE	37	Air	1
<i>L. monocytogenes</i>	FRDC 88171	FRDC	6	TSBYE	37	Air	1
<i>L. monocytogenes</i>	FRDC 8853	FRDC	6	TSBYE	37	Air	1
<i>L. monocytogenes</i>	FRDC 8856	FRDC	6	TSBYE	37	Air	1
<i>L. monocytogenes</i>	FRDC Lm 04	FRDC	5	TSBYE	37	Air	1
<i>L. monocytogenes</i>	FRDC Lm 21	FRDC	6	TSBYE	37	Air	1

**Table 4.1. Bacterial strains and test conditions (continued)**

Indicator species	Strain	Source <sup>a</sup>	Test conditions <sup>b</sup>				
			Number of repetitions	Media	Temp. (°C)	Atmosphere	Time (d)
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	ATCC 700301	ATCC	4	TSBYE	37	Air	1
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	ATCC 700302	ATCC	4	TSBYE	37	Air	1
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	HPB 3	HPB	7	TSBYE	37	Air	1
<i>L. monocytogenes</i> ser. 3	ATCC 19113	ATCC	6	TSBYE	37	Air	1
<i>L. murrayi</i>	ATCC 25401	ATCC	5	TSBYE	37	Air	1
<i>L. murrayi</i>	HPB 30	HPB	3	TSBYE	37	Air	1
<i>L. seeligeri</i>	ATCC 35967	ATCC	5	TSBYE	37	Air	1
<i>L. seeligeri</i>	HPB 62	HPB	3	TSBYE	37	Air	1
<i>L. welshimeri</i>	ATCC 35897	ATCC	5	TSBYE	37	Air	1
<i>L. welshimeri</i>	HPB 89	HPB	3	TSBYE	37	Air	1
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 272	ATCC	12	TSBYE	37	Shaking	1
<i>M. luteus</i>	ATCC 400	ATCC	3	TSBYE	25	Air	5
<i>M. luteus</i>	ATCC 4698	ATCC	8	TSBYE	37	Shaking	1
<i>M. luteus</i>	ATCC 9341	ATCC	4	TSBYE	37	Shaking	1
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	ATCC 35797	ATCC	3	TSBYE	25	Air	3
<i>M. smegmatis</i>	ATCC 35798	ATCC	3	TSBYE	25	Air	3
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	007, 013x, 016, 017, 022, 071940, 141, 167, 265, 31540, INF2, INF4	CHUL, Castro et al. (5)	3, 3, 3, 3, 4, 3, 5, 3, 4, 4, 3, 3	BHI + B	37	CO <sub>2</sub>	2
<i>N. gonorrhoeae</i>	ATCC 27628	ATCC	6	BHI + B	37	CO <sub>2</sub>	2
<i>N. meningitidis</i>	ATCC 13077	ATCC	9	BHI + B	37	CO <sub>2</sub>	1



**Table 4.1. Bacterial strains and test conditions (continued)**

Indicator species	Strain	Source <sup>a</sup>	Test conditions <sup>b</sup>				
			Number of repetitions	Media	Temp. (°C)	Atmosphere	Time (d)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	UL5, R1, R1M,T5	Goulhen et al. (17)	4, 4, 4, 3	MRS	37	Air	1
<i>Peptostreptococcus magnus</i>	ATCC 29328	ATCC	4	TSBYE	37	Ana	3
<i>P. micros</i>	ATCC 33270	ATCC	4	TSBYE	37	Ana	5
<i>Propionibacterium acnes</i>	UD	Grenier	5	TSBYE	37	Ana	5
<i>P. acnes</i>	EXC-1	Fujimura	4	TSBYE	37	Ana	5
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	ATCC	3	TSBYE	37	Air	1
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	ATCC	3	TSBYE	37	Air	1
<i>S. aureus</i>	ATCC 43300	ATCC	9	TSBYE	37	Air	1
<i>S. aureus</i>	R621, R629, R630, R650, R678, R694, R695	CHUL	4, 3, 3, 4, 3, 3, 3	TSBYE	37	Air	1
<i>S. aureus</i>	D2.5, M3.18	Trudel et al. (57)	4, 5	TSBYE	37	Air	1
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 12228	ATCC	5	TSBYE	37	Air	1
<i>S. epidermidis</i>	HL 1656, HL 3176	HL	6, 10	TSBYE	37	Air	1
<i>S. epidermidis</i>	DSM 3095	DSM	5	TSBYE	37	Air	1
<i>S. gallinarum</i>	DSM 4616	DSM	4	TSBYE	37	Air	1
<i>S. haemolyticus</i>	HL 2344	HL	10	TSBYE	37	Air	1
<i>S. saprophyticus</i>	BALB/c	Rodrigue et al. (51)	3	TSBYE	37	Air	1
<i>S. xylosus</i>	BALB/c	Rodrigue et al. (51)	3	TSBYE	37	Air	1
<i>streptococci group C</i>	LSPQ 3377	LSPQ	6	TSBYE	37	Ana	1
<i>streptococci group F</i>	LSPQ 3374	LSPQ	3	TSBYE	37	Ana	1

**Table 4.1. Bacterial strains and test conditions (continued)**

Indicator species	Strain	Source <sup>a</sup>	Test conditions <sup>b</sup>				
			Number of repetitions	Media	Temp. (°C)	Atmosphere	Time (d)
<i>streptococci group G</i>	LSPQ 3375	LSPQ	7	TSBYE	37	Ana	1
<i>Streptococcus agalactiae</i>	BALB/c	Rodrigue et al. (50)	3	TSBYE	37	Ana	1
<i>S. bovis</i>	ATCC 35034	ATCC	3	TSBYE	37	Ana	1
<i>S. mutans</i>	BHT	Delisle (10)	5	TSBYE	37	Ana	1
<i>S. mutans</i>	32K	Kurita et al. (27)	5	TSBYE	37	Ana	1
<i>S. mutans</i>	ATCC 33534	ATCC	3	TSBYE	37	Ana	1
<i>S. mutans</i>	ATCC 33535	ATCC	3	TSBYE	37	Ana	1
<i>S. mutans</i>	ATCC 35668	ATCC	3	TSBYE	37	Ana	1
<i>S. mutans</i>	Ny266 (ATCC 202022)	Van der Hoeven	7	TSBYE	37	Ana	1
<i>S. mutans</i>	JH 1140	Hillman et al. (21)	7	TSBYE	37	Ana	1
<i>S. pneumoniae</i>	ATCC 6303	ATCC	3	TSBYE	37	Ana	1
<i>S. pneumoniae</i>	ULM	CHUL	4	TSBYE	37	Ana	1
<i>S. pyogenes</i>	ULM	CHUL	4	TSBYE	37	Ana	1
<i>S. suis</i> serotype 2		GREMIP	4	TSBYE	37	Ana	1
<i>S. uberis</i>	ATCC 27958	ATCC	4	TSBYE	37	Ana	1

<sup>a</sup> Origin of strains: ATCC, American Type Culture Collection (Manassas, VA); CHUL, Centre Hospitalier de l'Université Laval (Laboratoire d'infectiologie); DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Germany); FRDC, Food Research and Development Center (Agriculture and Agrifood Canada, St-Hyacinthe, QC, Canada); GREMIP (Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, QC, Canada); HL, Hôpital Laval (Québec, QC, Canada); HPB, Health Protection Branch (Health Canada, Ottawa, ON, Canada); LSPQ, Laboratoire de Santé Publique du Québec (Ste-Anne-de-Bellevue, QC, Canada); NCTC, National Collection of Type Cultures (London, UK); U. I. M. Castro, M.S. thesis, Université Laval, Québec, QC, Canada, 1992; S. Fujimura (Dept Oral Microbiology, Matsumoto Dental College, Shiojiri City, Nagano Prefecture,

Japan); D. Grenier (Dental School, Université Laval, Québec, QC, Canada); J. Lapointe (Dept of Biochemistry, Université Laval, Québec, QC, Canada); J. S. Van der Hoeven (Dept. Preventive Dentistry, Univ. Nijmegen, Nijmegen, The Netherlands).

- <sup>b</sup> Incubation conditions: Air, incubated under aerobic conditions; Ana, incubated under anaerobic conditions (80% N<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>) in a Coy glove box (Model 12467, Coy Laboratory Products Inc., Ann Arbor, MI); CO<sub>2</sub>, incubated under microaerophilic conditions (5% CO<sub>2</sub>) in a CO<sub>2</sub> incubator (Napco Controlled Environment 6100, National Appliance, Portland, OR); Shaking, incubated under aerobic conditions with agitation; BHI, Brain-Heart Infusion (Difco, Detroit, MI); MRS broth (BDH Inc., Darmstadt, West Germany); TSBYE, Trypticase Soy Broth (Difco) enriched with 0.3% yeast extract (Difco); B, 1% supplement B (Difco); FBS, 5% Fetal Bovine Serum (Gibco BRL, Grand Island, NY).

**Table 4.2. Antibiotic resistance patterns of clinical and mouse isolates as determined by antibiogram.**

Organism	Antibiotic resistance pattern <sup>a</sup>
<i>Neisseria meningitidis</i> ATCC 13077	L-TMP-VA
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	
013x	AM-L-OX-P-TMP
016	AM-L-OX-P
017	AM-L-N-OX-P-PB-TMP
022	L-N-OX-P-PB-G-TMP-VA
071940	L-OX-PB
141	L-N
167	AM-L-OX-P-TMP
265	PB-TMP
31540	OX-PB-TMP
INF2	L-OX-PB-TMP-VA
INF4	L-N-OX-PB-S-TMP-VA
<i>Enterococcus faecalis</i>	
ATCC 27275	L-NA-N-OX-PB-S-G-TE
2D4.22	L-NA-N-OX-PB-RA-G
2L5.07	CF-L-NA-N-OX-P-PB-S-G
78.4, S1.17	L-NA-N-OX-PB-S-G
EF-Chul	E-GM-K-L-NA-N-OX-PB-S-G-TE-TMP-VA
D2.20, L2.4, M2.01	NA-N-OX-PB-S-G-TE
HL 1148	L-NA-OX-PB-S-G-TE
HL 900	GM-K-L-NA-N-OX-PB-RA-S-G-TE
<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 8043	CF-L-NA-N-OX-PB-S-G
<i>Staphylococcus aureus</i>	
ATCC 43300	AM-P
R621	AM-E-OX-P
R629, R630, R694	AM-OX-P
R650	AM-K-NA-OX-P-S-TE
R678	AM-E-K-L-NA-OX-P
R695	AM-OX-P-TMP

**Table 4.2. Antibiotic resistance patterns (continued)**

Organism	Antibiotic resistance pattern <sup>a</sup>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
ATCC 12228	AM-P-G-TE
HL 3176	AM-E-K-L-OX-P
HL 1656	AM-E-K-L-OX-P-RA-S-TE
M3.18	AM-P
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> HL 2344	AM-C-E-K-L-NA-OX-P-S-TE-TMP
<i>Staphylococcus xylosus</i> MRL/LPR	NA
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> MRL/LPR	NA

<sup>a</sup> AM= ampicillin, CF= cephalotin, C= chloramphenicol, E= erythromycin, GM = gentamycin, K= kanamycin, L= lincomycin, NA= nalidixic acid, N= neomycin, OX= oxacillin, P= penicillin, PB= polymyxin B, RA= rifampin, S= streptomycin, G= sulfisoxazole, TE= tetracycline, TMP= trimethoprim, V= vancomycin.

**Table 4.3. Activity of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin and oxacillin against four *Micrococcus luteus* strains.**

<i>M. luteus</i> strains	MIC <sup>a</sup> (µg/ml)			
	Mutacin B-Ny266	Nisin A	Vancomycin	Oxacillin
ATCC 272	0.05 (0.03-0.05)	0.7 (0.3-1.1)	0.5 (0.5-1.0)	2.1 (1.1-2.1)
ATCC 400	0.2 (0.2-0.4)	0.3 (0.3-0.3)	0.5 (0.5-1.0)	4.1 (2.1-4.2)
ATCC 4698	0.4 (0.4-0.8)	8.4 (8.4-16.7)	2.0 (1.0-2.0)	2.1 (1.1-2.1)
ATCC 9341	0.2 (0.2-0.4)	1.1 (0.5-2.1)	1.0 (1.0-1.0)	0.02 (0.01-0.03)

<sup>a</sup> The MIC data are expressed as the median and range (in parentheses) obtained from at least three repetitions (as described in Table 4.1).

**Table 4.4. Activity of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin and oxacillin against enterococci.**

Enterococci strains	MIC <sup>a</sup> (µg/ml)			
	Mutacin B-Ny266	Nisin A	Vancomycin	Oxacillin
<i>E. hirae</i> ATCC 8043	12.8 (6.4-16.0)	16.7 (16.7-20.9)	4.0 (4.0-4.0)	8.4 (8.4-7.9)
<i>E. faecalis</i>				
ATCC 27275	12.8 (12.8-25.6)	14.3 (8.4-16.7)	4.0 (2.0-4.0)	8.4 (7.9-8.4)
Mouse isolates				
2D4.22	15.4 (12.4-25.6)	18.8 (16.7-33.4)	2.0 (2.0-2.0)	15.9 (15.8-31.7)
2L5.07	6.4 (6.4-12.8)	8.4 (8.4-16.7)	1.9 (1.9-2.0)	31.7 (15.8-63.4)
78.4	1.6 (1.6-3.2)	8.4 (8.4-8.4)	2.0 (2.0-2.0)	11.9 (8.4-11.9)
D2.20	19.2 (12.8-25.6)	13.6 (8.4-16.7)	4.0 (4.0-4.0)	8.4 (8.4-8.4)
L2.4	12.8 (12.8-25.6)	8.4 (8.4-20.9)	4.0 (4.0-4.0)	8.4 (4.2-8.4)
M2.01	14.4 (12.8-25.6)	8.4 (8.4-16.7)	4.0 (2.0-4.0)	8.4 (6.0-15.9)
S1.17	12.8 (12.8-25.6)	16.7 (8.4-23.7)	2.0 (2.0-2.0)	8.4 (8.4-11.9)
Clinical isolates				
EF- Chul	6.4 (6.4-6.4)	8.4 (8.4-16.7)	>120	10.2 (7.9-15.9)
HL 1148	6.4 (6.4-12.8)	16.7 (16.7-33.4)	4.0 (3.8-7.5)	31.7 (22.4-44.8)
HL 900	12.8 (8.0-25.6)	9.4 (8.4-20.9)	4.0 (4.0-4.0)	11.9 (8.4-15.9)

<sup>a</sup> The MIC data are expressed as the median and range (in parentheses) obtained from at least three repetitions (as described in Table 4.1).

**Table 4.5. Activity of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin and oxacillin against *Listeria* spp.**

<i>Listeria</i> strains	MIC <sup>a</sup> (µg/ml)			
	Mutacin B-Ny266	Nisin A	Vancomycin	Oxacillin
<i>L. grayi</i>	0.4	1.2	0.3	4.2
ATCC 19120, HPB 29	(0.4-0.8)	(1.1-2.1)	(0.3-0.5)	(4.0-4.2)
<i>L. innocua</i>	0.8	8.4	1.0	4.2
ATCC 33090, HPB 13	(0.8-1.6)	(5.2-16.7)	(1.0-2.0)	(4.0-8.4)
<i>L. ivanovii</i>	0.8	2.1	1.0	4.2
ATCC 19119, HPB 28	(0.8-0.8)	(1.1-2.1)	(0.5-1.0)	(2.1-6.0)
<i>L. monocytogenes</i>				
ATCC 15313	0.6	4.2	0.9	2.1
	(0.4-0.8)	(3.7-4.2)	(0.5-1.0)	(1.4-2.1)
ATCC 19113	0.6	1.8	0.6	1.1
	(0.4-1.6)	(1.1-2.1)	(0.5-2.0)	(0.5-1.1)
FRDC 1089	0.8	5.2	1.0	4.2
	(0.8-1.6)	(4.2-8.4)	(1.0-1.0)	(2.1-4.2)
FRDC 88171	0.8	8.4	1.0	2.1
	(0.8-1.0)	(4.2-16.7)	(1.0-1.0)	(2.0-4.2)
FRDC 8853	1.6	4.2	1.0	8.4
	(0.8-2.0)	(2.1-8.4)	(1.0-2.0)	(8.4-15.9)
FRDC 8856	1.2	4.2	1.0	4.2
	(0.8-1.6)	(3.0-10.5)	(1.0-2.0)	(4.2-7.9)
FRDC Lm 04	1.6	4.2	1.0	6.0
	(1.0-1.6)	(2.1-8.4)	(1.0-2.0)	(4.2-8.4)
FRDC Lm 21	1.6	8.4	1.4	6.0
	(0.8-1.6)	(4.2-10.5)	(1.0-2.0)	(6.0-8.4)
<i>L. murrayi</i>	0.4	2.1	0.3	4.2
ATCC 25401, HPB 30	(0.4-0.8)	(1.1-2.1)	(0.3-0.5)	(4.0-8.4)
<i>L. seeligeri</i>	0.8	2.1	0.5	0.8
ATCC 35967, HPB 62	(0.4-1.6)	(1.3-4.2)	(0.3-1.0)	(0.5-2.1)
<i>L. welshimeri</i>	0.8	5.2	2.0	4.2
ATCC 35897, HPB 89	(0.8-0.8)	(4.2-8.4)	(1.0-2.0)	(2.0-4.2)

<sup>a</sup> The MIC data are expressed as the median and range (in parentheses) obtained from at least three repetitions (as described in Table 4.1).



**Table 4.6. Activity of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin and oxacillin against staphylococci.**

Staphylococci strains	MIC <sup>a</sup> (µg/ml)			
	Mutacin B-Ny266	Nisin A	Vancomycin	Oxacillin
<i>Staphylococcus aureus</i>				
ATCC 25923	3.2 (1.6-3.2)	7.1 (6.0-8.4)	4.0 (2.0-8.0)	0.3 (0.3-1.1)
ATCC 43300	3.2 (3.2-6.4)	10.1 (8.4-16.7)	2.8 (1.9-8.0)	7.9 (4.0-15.9)
ATCC 6538	1.6 (1.6-3.2)	4.2 (1.5-4.2)	2.0 (1.0-2.0)	0.2 (0.1-0.2)
Clinical isolates				
R621	3.2 (3.2-3.2)	8.4 (5.9-8.4)	2.3 (1.9-3.8)	23.8 (15.9-31.7)
R629	1.6 (1.6-3.2)	4.2 (2.1-8.4)	1.9 (1.9-3.8)	38.3 (31.7-44.8)
R630	1.6 (1.1-1.6)	5.7 (2.1-8.4)	3.8 (1.9-3.8)	38.3 (31.7-44.8)
R650	3.2 (3.2-4.5)	8.4 (4.2-8.4)	3.8 (3.8-3.8)	44.8 (15.9-63.4)
R678	3.2 (3.2-3.2)	8.4 (4.2-8.4)	2.7 (1.9-3.8)	15.9 (15.9-63.4)
R694	2.3 (1.6-3.2)	2.1 (2.1-2.1)	2.3 (1.9-3.8)	31.7 (22.4-63.4)
R695	3.2 (3.2-3.2)	5.9 (5.9-8.4)	2.7 (1.9-2.7)	31.7 (15.9-63.4)
Mouse isolates				
D2.5	3.2 (1.6-3.2)	4.2 (4.2-8.4)	3.2 (1.9-5.3)	0.1 (0.1-0.2)
M3.18	3.2 (1.6-3.2)	8.4 (4.2-8.4)	3.8 (3.8-5.3)	1.0 (0.5-2.0)

**Table 4.6. Activity against staphylococci (continued)**

Staphylococci strains	MIC <sup>a</sup> (µg/ml)			
	Mutacin B-Ny266	Nisin A	Vancomycin	Oxacillin
<i>S. epidermidis</i>				
ATCC 12228	0.8 (0.8-1.6)	2.1 (2.1-6.0)	2.0 (2.0-4.0)	0.3 (0.1-0.4)
Clinical isolates				
HL 1656	1.6 (1.1-3.2)	3.0 (2.1-4.2)	4.0 (2.0-4.0)	8.4 (7.9-15.9)
HL 3176	1.6 (0.8-1.6)	3.0 (2.1-4.2)	3.8 (2.0-4.0)	>127
<i>S. haemolyticus</i> HL 2344	0.8 (0.8-0.8)	4.2 (2.1-4.2)	2.8 (1.9-4.0)	>127
<i>S. saprophyticus</i> BALB/c	0.2 (0.1-0.4)	2.1 (2.1-2.1)	2.0 (2.0-4.0)	2.1 (2.1-2.1)
<i>S. xylosus</i> BALB/c	0.2 (0.2-0.4)	8.4 (8.4-16.7)	0.3 (0.3-0.5)	0.5 (0.5-0.8)

<sup>a</sup> The MIC data are expressed as the median and range (in parentheses) obtained from at least three repetitions (as described in Table 4.1).

**Table 4.7. Activity of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin and oxacillin against streptococci.**

Streptococci strains	MIC <sup>a</sup> (µg/ml)			
	Mutacin B-Ny266	Nisin A	Vancomycin	Oxacillin
<i>S. agalactiae</i> BALB/c	0.3 (0.3-0.8)	1.6 (1.0-2.1)	0.6 (0.5-1.0)	0.1 (0.1-0.5)
<i>S. bovis</i> ATCC 35034	0.2 (0.2-0.4)	8.4 (8.4-11.8)	0.5 (0.5-0.5)	0.5 (0.5-0.8)
<i>Streptococcus</i> group C	0.4 (0.2-0.4)	8.4 (4.2-8.4)	0.5 (0.3-0.5)	0.05 (0.05-0.1)
<i>Streptococcus</i> group F	1.6 (0.8-1.6)	5.9 (5.9-8.4)	1.0 (1.0-1.0)	0.5 (0.5-0.8)
<i>Streptococcus</i> group G	0.4 (0.4-0.4)	8.4 (8.4-16.7)	0.5 (0.3-0.5)	0.1 (0.05-0.1)
<i>S. mutans</i>				
ATCC 33534	0.3 (0.2-0.4)	1.1 (0.3-1.1)	0.3 (0.3-0.5)	0.2 (0.1-0.3)
ATCC 33535	0.4 (0.4-0.4)	6.3 (4.2-10.5)	1.0 (0.5-1.0)	0.5 (0.03-1.1)
ATCC 35668	0.6 (0.6-0.8)	33.4 (16.7-33.4)	1.0 (1.0-1.0)	0.1 (0.1-0.1)
<i>S. pneumoniae</i>				
ATCC 6303	0.8 (0.8-0.8)	2.1 (1.1-2.1)	0.5 (0.3-0.5)	0.05 (0.02-0.05)
ULM	0.2 (0.1-0.4)	1.1 (1.1-2.1)	0.5 (0.5-0.5)	0.03 (0.03-0.05)
<i>S. pyogenes</i> ULM	0.4 (0.2-0.8)	8.4 (4.2-16.7)	0.5 (0.3-0.5)	0.05 (0.02-0.05)
<i>S. suis</i> serotype 2	1.6 (0.8-1.6)	2.1 (2.1-4.2)	0.5 (0.5-0.5)	0.9 (0.5-1.1)
<i>S. uberis</i> ATCC 27958	0.04 (0.03-0.08)	1.1 (0.5-2.1)	0.5 (0.5-1.0)	0.1 (0.05-0.1)

<sup>a</sup> The MIC data are expressed as the median and range (in parentheses) obtained from at least three repetitions (as described in Table 4.1).

**Table 4.8. Activity of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin and oxacillin against spore-forming Gram-positive bacilli.**

Organism	MIC <sup>a</sup> (µg/ml)			
	Mutacin B-Ny266	Nisin A	Vancomycin	Oxacillin
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 2	5.2 (3.2-6.4)	8.4 (4.2-10.5)	1.0 (1.0-1.0)	>127
<i>B. coagulans</i> ATCC 7050	0.03 (0.006-0.06)	0.2 (0.02-0.4)	0.3 (0.1-0.3)	0.1 (0.1-0.3)
<i>B. subtilis</i> 168 T	0.8 (0.4-0.8)	4.2 (2.2-5.2)	0.5 (0.5-0.5)	0.3 (0.3-0.3)
<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 7953	0.005 (0.005-0.005)	0.01 (0.01-0.01)	0.5 (0.4-0.5)	0.002 (0.002-0.003)
<i>Clostridium bifermentans</i> 2D1.04	0.2 (0.1-0.2)	0.5 (0.5-1.1)	0.3 (0.3-0.3)	2.1 (2.1-2.1)
<i>C. butyricum</i> ATCC 860	0.05 (0.02-0.08)	0.3 (0.1-1.1)	0.5 (0.3-0.7)	4.2 (2.1-4.2)
<i>C. perfringens</i> ATCC 3628	0.05 (0.02-0.1)	0.2 (0.1-1.1)	0.3 (0.3-0.5)	0.07 (0.07-0.1)
<i>C. sporogenes</i> ATCC 19404	1.6 (0.8-3.2)	4.2 (1.1-4.2)	4.0 (2.0-4.0)	1.1 (0.5-1.1)

<sup>a</sup> The MIC data are expressed as the median and range (in parentheses) obtained from at least three repetitions (as described in Table 4.1).

**Table 4.9. Activity of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin and oxacillin against miscellaneous Gram-positive pathogens.**

Organism	MIC <sup>a</sup> (µg/ml)			
	Mutacin B-Ny266	Nisin A	Vancomycin	Oxacillin
<i>Actinomyces viscosus</i> Ny1	0.4 (0.4-0.8)	83.6 (41.8-83.6)	0.5 (0.5-1.0)	0.5 (0.5-0.8)
<i>Peptostreptococcus magnus</i> ATCC 29328	0.4 (0.2-0.8)	1.1 (1.1-2.1)	0.8 (0.5-1.0)	0.2 (0.1-0.3)
<i>Peptostreptococcus micros</i> ATCC 33270	0.4 (0.4-0.8)	2.1 (1.1-2.1)	0.5 (0.5-1.0)	0.3 (0.3-0.5)
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> LSPQ 3076	0.4 (0.4-0.8)	4.2 (4.2-8.4)	1.0 (0.5-1.0)	2.1 (1.1-2.1)
<i>Gardnerella vaginalis</i> ATCC 14018	0.03 (0.01-0.05)	1.1 (1.1-2.1)	0.4 (0.3-0.5)	0.1 (0.07-0.1)
<i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC 35797	40.0 (24.6-69.9)	8.4 (7.4-14.8)	8.0 (8.0-8.0)	63.4 (63.4-127)
<i>M. smegmatis</i> ATCC 35798	36.9 (24.6-49.2)	8.4 (7.4-14.8)	8.0 (8.0-15)	127 (63.4-127)
<i>Propionibacterium acnes</i> EXC-1	1.6 (0.8-1.6)	2.1 (2.1-4.2)	1.0 (1.0-1.0)	0.8 (0.5-1.1)
<i>Propionibacterium acnes</i> UD	0.8 (0.8-1.6)	2.1 (1.1-4.2)	0.5 (0.5-1.0)	0.5 (0.5-1.1)

<sup>a</sup> The MIC data are expressed as the median and range (in parentheses) obtained from at least three repetitions (as described in Table 4.1).

**Table 4.10. Activity of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin and oxacillin against Gram-negative pathogens.**

Organism	MIC <sup>a</sup> (µg/ml)			
	Mutacin B-Ny266	Nisin A	Vancomycin	Oxacillin
<i>Bordetella bronchiseptica</i> LSPQ 2021	49.2 (25.6-80.0)	>836	>120	>127
<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 29428	0.07 (0.01-0.1)	1.1 (0.3-1.5)	1.0 (1.0-2.0)	0.1 (0.05-1.5)
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 8142	12.8 (12.8-25.6)	66.9 (33.4-83.6)	>120	63.4 (44.8-63.4)
<i>Helicobacter pylori</i> ATCC 43504	0.03 (0.03-0.05)	0.1 (0.07-0.1)	1.0 (1.0-1.0)	0.5 (0.3-0.5)
<i>H. pylori</i> NCTC 11638	0.4 (0.4-0.4)	1.5 (1.5-2.1)	0.9 (0.7-1.0)	0.8 (0.4-1.1)

<sup>a</sup> The MIC data are expressed as the median and range (in parentheses) obtained from at least three repetitions (as described in Table 4.1).

**Table 4.11. Activity of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin and oxacillin against *Neisseria* strains.**

<i>Neisseria</i> strains	MIC <sup>a</sup> (µg/ml)			
	Mutacin B-Ny266	Nisin A	Vancomycin	Oxacillin
<i>Neisseria meningitidis</i> ATCC 13077	1.6 (1.6-3.2)	6.3 (4.2-8.4)	>120	2.1 (2.1-4.2)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC 27628	1.6 (1.6-3.2)	8.4 (4.2-8.4)	8.0 (7.5-15.0)	0.3 (0.2-0.5)
Clinical isolates				
INF2	2.3 (2.3-2.3)	8.4 (8.4-8.4)	60.2 (30.1-60.2)	31.7 (15.9-31.7)
INF4	2.0 (1.1-3.2)	7.1 (4.2-16.7)	30.1 (30.1-30.1)	15.9 (7.9-15.9)
007	1.6 (1.6-2.3)	8.4 (8.4-8.4)	21.3 (15.1-60.2)	> 127
013x	1.6 (0.8-3.2)	4.2 (4.2-8.4)	30.1 (30.1-42.6)	127 (127-127)
016	3.2 (1.6-3.2)	8.4 (8.4-8.4)	30.2 (15.1-31.0)	> 127
017	2.3 (1.6-3.2)	8.4 (4.2-8.4)	30.6 (30.1-42.6)	> 127
022	3.2 (2.2-6.4)	11.8 (8.4-16.7)	60.2 (30.1-120.4)	31.7 (22.4-63.4)
141	0.8 (0.8-1.6)	5.9 (4.2-8.4)	15.1 (8.0-30.1)	0.6 (0.2-0.8)
167	1.6 (0.8-1.6)	7.1 (5.9-8.4)	25.7 (15.1-60.2)	95.1 (63.4-126.8)
265	1.6 (1.2-2.3)	5.9 (5.9-8.4)	21.3 (15.1-30.1)	13.5 (11.2-15.9)
31540	3.1 (1.6-3.2)	8.4 (5.9-11.8)	72.7 (30.1-85.1)	54.1 (31.7-63.4)
071940	1.6 (1.6-1.6)	4.2 (4.2-4.2)	30.1 (30.1-60.2)	9.8 (8.5-11.2)

<sup>a</sup> The MIC data are expressed as the median and range (in parentheses) obtained from at least three repetitions (as described in Table 4.1).

**Table 4.12. Activity of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin and oxacillin against other lantibiotic-producing strains.**

Producing strains	Lantibiotic produced	MIC <sup>a</sup> (µg/ml)			
		Mutacin B-Ny266	Nisin A	Vancomycin	Oxacillin
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Subtilin	1.6 (1.0-1.6)	8.4 (8.4-10.5)	0.5 (0.3-0.5)	0.5 (0.5-0.5)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454	Nisin A	1.0 (0.8-1.6)	27.2 (20.9-33.4)	0.5 (0.5-1.0)	2.1 (1.1-4.2)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> UL 719	Nisin Z	0.8 (0.8-1.6)	33.4 (33.4-41.8)	1.0 (0.5-1.0)	4.0 (3.0-4.2)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> DSM 3095	Epidermin	12.8 (8.8-18.2)	83.6 (66.8-83.6)	8.0 (7.5-15.1)	0.2 (0.1-0.3)
<i>Staphylococcus gallinarum</i> DSM 4616	Gallidermin	1.6 (1.6-1.6)	2.1 (2.1-3.0)	2.0 (2.0-2.0)	0.8 (0.8-1.1)
<i>Streptococcus mutans</i> BHT	Mutacin b	0.8 (0.4-0.8)	16.7 (8.4-16.7)	0.5 (0.5-0.5)	0.2 (0.2-0.4)
<i>Streptococcus mutans</i> 32K	Mutalipocin	0.8 (0.8-1.6)	83.6 (41.8-83.6)	0.8 (0.5-1.0)	0.1 (0.1-0.3)
<i>Streptococcus mutans</i> JH1140	Mutacin B-1140	1.6 (0.8-1.6)	41.8 (41.8-83.6)	1.0 (1.0-1.0)	0.05 (0.05-0.1)
<i>Streptococcus mutans</i> Ny266 (ATCC 202022)	Mutacin B-Ny266	4.8 (3.2-6.4)	33.4 (16.7-33.4)	1.0 (1.0-1.0)	0.1 (0.03-0.1)

<sup>a</sup> The MIC data are expressed as the median and range (in parentheses) obtained from at least three repetitions (as described in Table 4.1).



**Table 4.13. Activity of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin and oxacillin against nisin-resistant mutants.**

Antimicrobial substances	MIC <sup>a</sup> (µg/ml)						
	<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A			<i>Pediococcus acidilactici</i>			
	HPB 3	Resistant mutants <sup>b</sup>		UL 5	Resistant mutants <sup>c</sup>		
		ATCC 700301	ATCC 700302		R1	R1M	T5
<b>Mutacin B-Ny266</b>	1.6 (0.8-1.6)	1.0 (0.8-1.6)	1.4 (0.8-1.6)	0.4 (0.2-0.4)	0.8 (0.8-0.8)	3.2 (3.2-3.2)	1.6 (1.6-1.6)
<b>Nisin A</b>	5.9 (4.2-10.5)	16.7 (16.7-16.7)	16.7 (16.7-16.7)	0.03 (0.02-0.07)	6.8 (3.4-8.4)	41.8 (23.7-47.3)	41.8 (41.8-41.8)
<b>Vancomycin</b>	1.4 (1.0-2.0)	1.0 (1.0-1.0)	1.0 (1.0-1.0)	> 120	> 120	> 120	> 120
<b>Oxacillin</b>	7.9 (5.6-8.5)	1.5 (1.5-2.1)	2.6 (2.1-3.0)	7.9 (7.9-15.9)	4.0 (2.8-4.2)	2.8 (2.0-3.0)	2.1 (2.0-4.0)

<sup>a</sup> The MIC data are expressed as the median and range (in parentheses) obtained from at least three repetitions (as described in Table 4.1).

<sup>b</sup> Crandall *et al.* (14); Mazzotta *et al.* (48)

<sup>c</sup> Goulhen *et al.* (27)

## **CHAPITRE V**

### **DISCUSSION ET CONCLUSIONS**

L'ensemble des expériences a permis d'atteindre les objectifs fixés au début de la thèse. Nous avons sélectionné une souche de *S. mutans* (Ny266) productrice de bactériocine avec un spectre d'activité étendu contre les souches pathogènes d'intérêt alimentaire et clinique (objectif 1). Nous avons purifié le peptide actif et établi sa structure primaire et nous avons effectué sa caractérisation (objectif 2). Nous avons comparé l'efficacité de la mutacine B-Ny266 à celle de la nisine et à celles de deux antibiotiques de dernier recours (oxacilline et vancomycine) afin de proposer son usage comme bioconservateur alimentaire ou comme agent thérapeutique contre différentes infections bactériennes (objectif 3). Les résultats de la caractérisation de la mutacine B-Ny266 ont été publiés dans le « FEBS Letters ». Ils ont conduit au dépôt de demande de brevets canadien (No 2,209,893) et américain (dossier No 12406.3) et ont également suscité un intérêt de la part de l'industrie pharmaceutique.

### SÉLECTION D'UNE SOUCHE PRODUCTRICE

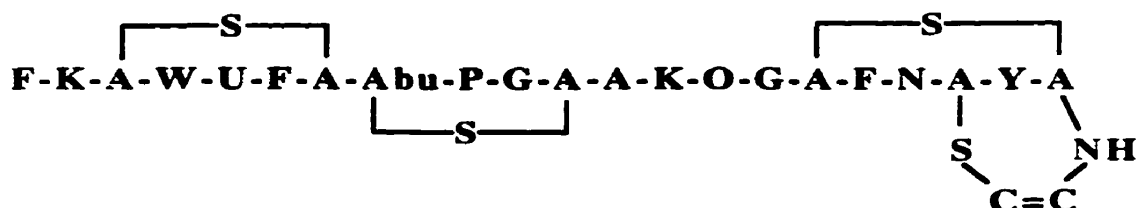
Les résultats des tests d'antagonisme différé utilisés pour sélectionner une souche productrice de mutacine ont démontré que la souche de *S. mutans* Ny266 produit une substance classée parmi les mutacines du groupe B (Morency *et al.* 1995) qui possède un spectre d'action étendu. La substance a inhibé toutes les souches d'entérocoques, de streptocoques et de staphylocoques testées ainsi que les isolats cliniques de *Neisseria gonorrhoeae* résistants aux antibiotiques. Elle a inhibé également les souches de *Campylobacter jejuni* et d'*Helicobacter pylori* testées.

### CARACTÉRISATION

La mutacine B-Ny266 a été purifiée, séquencée et caractérisée. C'est un lantibiotique de type A appartenant à la classe AI (séquence signal du type NFLD) et au groupe épidermine. Comme pour les lantibiotiques de la classe AI, la mutacine B-Ny266 est cationique (+3). La séquence de la pro-mutacine B-Ny266 (Mota-Meira *et al.* 1997) a été confirmée récemment par la séquence du gène de structure (*lanA*; G. LaPointe, communication personnelle). Tous les résidus Cys (4), Ser (4) et Thr (2) du pro-peptide sont modifiés dans le peptide mature.

Quatre ponts thioéthers sont formés à l'aide de quatre Cys et de trois dhA (deux Lan ou A-S-A et un AviCys en C-terminal) et d'un dhB (MeLan ou Abu-S-A). La molécule contient en plus un résidu dhA (U) et un dhB (O). La localisation des ponts thioéthers proposée est basée sur les dérivés obtenus par la dégradation d'Edman, suite au traitement à l'éthanthiol alcalin, et sur l'analogie de la molécule avec l'épidermine (substance proche à la mutacine B-Ny266).

La structure primaire proposée par (Mota-Meira *et al.* 1997) pour la Mutacine B-Ny266 est la suivante:



**Mutacines et groupe épidermine.** Les lantibiotiques du groupe épidermine sont: épidermine, gallidermine, [V1,L6]-épidermine, mutacine B-Ny266, mutacine B-JH1140 et mutacine B-III (même séquence en acides aminés que la mutacine B-JH1140). Les trois mutacines font partie des mutacines du groupe B (Morency *et al.* 1995 et Morency *et al.* 1999). Leurs séquences diffèrent par 2 acides aminés en positions +6 et +13 et par 6 résidus dans le peptide signal (positions -9 à -12, -19 et -22) (G. LaPointe, communication personnelle). La localisation des résidus dhA et dhB ainsi que des deux premiers ponts thioéthers semblent être différents pour les mutacines B-Ny266 et B-JH1140 (Hillman *et al.* 1998) et similaires pour les mutacines B-Ny266 et B-III. Cette différence reste cependant à confirmer par spectroscopie RMN. La mutacine B-Ny266 diffère des épidermines par cinq résidus localisés en N-terminal. Sahl et Bierbaum (1998) ont classé la mutacine B-Ny266 comme étant un variant de l'épidermine ([F1,K2,W3,U5,F6]-épidermine). Cependant, ces molécules diffèrent au niveau de 23% des acides aminés, tandis que les variants gallidermine et [V1,L6]-épidermine ne diffèrent que par 4,5 % et 9 % respectivement. De plus, la séquence signal de la mutacine B-Ny266 (41 résidus) diffère de la séquence signal de l'épidermine (30 résidus) (G. LaPointe, communication personnelle). Étant donné la similarité des épidermines et des mutacines B-Ny266 et B-JH1140, ces peptides ont été classés dans le groupe épidermine

## EFFICACITÉ ET APPLICATIONS POTENTIELLES

Nous avons déterminé l'activité de la mutacine B-Ny266 par rapport à la nisine A et à deux antibiotiques (oxacilline et vancomycine). La concentration minimale inhibitrice (CMI) contre des souches pathogènes et des souches multirésistantes aux antibiotiques a été utilisée comme critère de comparaison des quatre substances. Nos résultats indiquent que, pour la plupart des souches testées, l'activité de la mutacine B-Ny266 et de la nisine A sont semblables à celle de la vancomycine et de l'oxacilline. Cependant, la mutacine B-Ny266 est active contre les souches résistantes à la nisine, à la vancomycine ou à l'oxacilline. La mutacine B-Ny266 a un spectre d'action étendu. Elle est active contre les souches résistantes à la nisine et aux antibiotiques classiques et aucun mutant résistant stable à la mutacine B-Ny266 n'a pu être obtenu jusqu'à présent (Dagry, 1996 M.Sc.; M. C. Lavoie, communication personnelle). Cette substance constitue donc une candidate intéressante pour un usage clinique éventuel. Nous proposons pour la mutacine B-Ny266 les mêmes applications que celles qui ont été suggérées pour la nisine (résumés dans le tableau 1.4), et son utilisation dans le traitement des infections dues aux staphylocoques, aux entérocoques et aux *Neisseria* multirésistants aux antibiotiques. Cependant, des études sur la toxicité de cet antimicrobien doivent être préalablement réalisées. Dans ce contexte, une compagnie pharmaceutique a manifesté un intérêt pour la mutacine B-Ny266 suite à la publication de la structure de la molécule et les résultats concernant l'activité de la mutacine (CMI) contre des souches pathogènes. L'étape suivante pour l'application de la mutacine B-Ny266 est la réalisation de tests, *in vivo*, chez des rongeurs. Cependant, l'étape limitante pour ce test demeure l'obtention d'une quantité suffisante de mutacine pure.

**Conservateur alimentaire:** La nisine, sous forme de nisapline, est utilisée comme bioconservateur alimentaire pour contrôler la contamination microbienne due à *Clostridium* sp. et *L. monocytogenes*. Généralement, *L. monocytogenes* est sensible aux antibiotiques utilisés actuellement. Cependant, des plasmides qui confèrent la résistance à certains antibiotiques ont été retrouvés chez plusieurs isolats cliniques (Swaminathan *et al.* 1995). De plus, l'utilisation d'antibiotiques dans les aliments est généralement prohibée. Comme pour la nisine, on pourrait envisager l'utilisation de la mutacine B-Ny266 comme conservateur alimentaire pour contrôler la contamination microbienne due à *L. monocytogenes* et aux *Clostridium* dans les produits laitiers tel le fromage à tartiné par exemple. La mutacine B-Ny266 est plus active que la nisine contre les 23 souches de *Listeria* testées, incluant celles résistantes à la nisine et l'activité de la mutacine est légèrement supérieure à celle de la nisine contre les souches de *Clostridium* (Mota-Meira *et al.* 1999). Cette application envisagée pour la mutacine dans le secteur alimentaire est cependant fort peu probable parce que ce peptide provient d'une souche considérée comme « pathogène » et par le caractère très limitant de la législation (réglementée par le FDA). Il serait donc préférable de cibler une utilisation dans le secteur médical et vétérinaire. Cependant, 50 % des individus de la population humaine hébergent des *S. mutans* sur leur dents. La carie et quelques rares endocardites (Marsh et Martin, 1992) sont les seules maladies provoquées par *S. mutans*. De plus, puisque la mutacine B-Ny266 est résistante aux protéases salivaires mais sensible aux enzymes digestives (Parrot *et al.* 1990) nous pouvons penser qu'elle sera dégradée dans l'intestin grêle et n'affectera pas les consommateurs.

**Mammite:** Une des utilisations proposées pour la nisine est le traitement de la mammite bovine, afin de remplacer les antibiotiques qui sont actuellement utilisés. La mutacine B-Ny266 est plus efficace que la nisine contre les souches de streptocoques (*S. agalactiae* et *S. uberis*) et de staphylocoques (*S. aureus*) impliquées dans la mammite (Mota-Meira *et al.* 1999). L'oxacilline est très efficace contre ces souches, cependant, son utilisation est compromise par l'apparition de souches de *S. aureus* résistantes (MRSA) et par le fait que cet antibiotique peut se retrouver dans le lait et compromettre son utilisation. Dans ce contexte, la mutacine semble être une candidate idéale pour le développement de produits contre la mammite.

**Utilisation clinique:** Puisque la mutacine B-Ny266 est active contre les souches multirésistantes de staphylocoques, d'entérocoques et de *Neisseria*, elle pourrait être utilisée comme agent thérapeutique dans le traitements d'infections bactériennes en remplacement des antibiotiques pour lesquels les souches bactériennes sont devenues résistantes.

**Usage topique:** La mutacine B-Ny266 est active contre les staphylocoques. Elle pourrait donc être utilisée dans les savons et produits de soin de la peau contre les staphylocoques et comme conservateur dans les cosmétiques. L'utilisation de la nisine dans des cosmétiques pour lutter contre l'acné a déjà été proposée (Harlander, 1993). La mutacine B-Ny266 possède une activité égale ou supérieure à la nisine contre *Propionibacterium acnes*. Nous pouvons donc envisager également son application topique contre l'eczéma et l'acné.

**Ulcères gastriques:** Comme la nisine la mutacine B-Ny266 pourrait être utilisée dans les traitements des ulcères et des infections bactériennes du colon provoquée par *Helicobacter pylori* et *Campylobacter jejuni*. La mutacine B-Ny266 démontre une activité supérieure à la nisine contre ces deux bactéries (Mota-Meira *et al.* 1999).

**Gonorrhée et méningite:** Nos résultats ont démontré que la mutacine B-Ny266 est efficace contre plusieurs souches de *Neisseria*. Elle pourrait donc être utilisée dans le traitement de la gonorrhée et de la méningite provoquées par *Neisseria*, mêmes contre les souches résistantes aux antibiotiques (Mota-Meira *et al.* 1999).

**Carie:** L'utilisation de la nisine pour prévenir les caries (comme agent anti-plaque) a été envisagée (Doel et Smith, 1993; Gaffar *et al.* 1994). Cependant, nos résultats démontrent que la majorité des souches de *S. mutans* testées (sept souches) sont résistantes à la nisine mais sensibles à la mutacine B-Ny266 (Mota-Meira *et al.* 1999). Ce fait démontre l'avantage de l'utilisation de la mutacine B-Ny266 par rapport à la nisine pour prévenir la carie dentaire. La mutacine B-Ny266 pourrait être incorporée dans les rince-bouches et dans les pâtes dentifrices.

## PERSPECTIVES D'AVENIR

Plusieurs projets de recherche permettraient de poursuivre les études amorcées dans cette thèse de Doctorat. Deux avenues principales pourraient être suivies: A) Recherches sur les possibilités d'application de la mutacine B-Ny266 en médecine humaine et vétérinaire, comme bioconservateur alimentaire, ou en cosmétologie. B) Recherches fondamentales concernant la structure, le mode d'action et les déterminants génétiques de la mutacine B-Ny266. Nous suggérons également que des études fondamentales et appliquées soient effectuées avec les mutacines des groupes A, C, D, I, K, L et M qui possèdent un spectre d'action intéressant contre des souches pathogènes d'intérêt clinique (Morency *et al.* 1999).

### A) APPLICATION

**A.1. Tester la stabilité** de la mutacine B-Ny266, en fonction du temps, du pH et de la température. Des résultats préliminaires indiquent que la mutacine B-Ny266 est relativement stable. Une grande stabilité à la température de la pièce serait un avantage pour son utilisation.

**A.2. Améliorer la production** de la mutacine B-Ny266, par l'optimisation des conditions de culture ou par le développement de mutants produisant une plus grande quantité de mutacine. Ces mutants pourraient être produits par exposition à des agents mutagènes ou génétiquement en utilisant la mutagenèse dirigée, clonage, transfert des gènes, etc.

Les conditions de fermentation sont également importantes pour la production des bactériocines. Des tests préliminaires (Morency et Lavoie, 1991) ont démontré une augmentation de la production en présence du lactose. Normalement, le milieu M17 est utilisé pour la production de la mutacine B-Ny266. Cependant, c'est un milieu riche en protéines (ce qui rend la purification difficile) et coûteux. Des résultats préliminaires (non-publiés) ont démontré que le remplacement de ce milieu par le perméat de lactosérum (riche en lactose) additionné d'extrait de levure, à pH contrôlé donne une production équivalente ou supérieure au milieu M17. L'avantage d'utiliser le perméat de lactosérum est qu'il est peu coûteux (rejet



de l'industrie fromagère) et ne contient pas de protéines, ce qui rend la purification plus facile. Cette méthode est actuellement utilisée avec succès dans le groupe de recherche du Dr Lacroix pour la production de la nisine Z et d'autres bactériocines produites par des bactéries lactiques (Amiali *et al.* 1998). Des études sur les différents facteurs de croissance (température, pH, agitation et oxygénation) et selon le mode de fermentation (en batch ou en continue avec des cellules immobilisées ou non) sont également envisagées.

La production des bactériocines a normalement lieu à la fin de la phase exponentielle de croissance et au début de la phase stationnaire. La concentration maximale de bactériocine (ex. nisine) retrouvée dans le surnageant serait alors proche du niveau toxique toléré par la souche productrice (de Vuyst et Vandamme, 1994). *S. mutans* Ny266 est sensible à sa propre mutacine à de faibles concentrations, de l'ordre de 5 µg/ml; contrairement à *L. lactis* ATCC 11454 par exemple, qui tolère une concentration de nisine A de l'ordre de 35 µg/ml (Mota-Meira *et al.* 1999). Nous pensons que si *S. mutans* Ny266 devient plus résistant à sa propre mutacine, le niveau de production pourrait augmenter.

**A.3. Optimiser les méthodes de purification de la mutacine B-Ny266.** Le rendement de la purification de la mutacine B-Ny266 n'est actuellement que de l'ordre de 1 %. Une amélioration de ce rendement constitue une étape essentielle à la poursuite des recherches tant fondamentales qu'appliquées concernant la mutacine B-Ny266. D'autres méthodes de purification qui viennent s'ajouter à la chromatographie par hydrophobicité devront être envisagées. D'autres méthodes de concentration à partir du surnageant devront également être testées: précipitation avec des solvants organique (chloroforme) et avec des sels (sulfate d'ammonium) et ensuite la chromatographie ionique.

**A.4. Tester l'efficacité de la mutacine B-Ny266 *in vivo***

**A.5. Tester la toxicité de la mutacine B-Ny266, *in vitro*, sur des cultures cellulaire et, *in vivo*, avec des rongeurs et des mammifères.**

**A.6. Essais cliniques**

Les trois derniers projets (A.4 à A.6) font actuellement l'objet de discussions avec une compagnie pharmaceutique. Ils nécessitent cependant une très grande quantité de mutacine B-Ny266 pure.

## **B) ÉTUDES FONDAMENTALES**

**B.1. Déterminer avec exactitude la localisation des ponts thioéthers et des résidus didéhydro de la mutacine B-Ny266 et comparer sa structure avec celle de la mutacine B-JH1140.** Une combinaison de méthodes pour confirmer la localisation de résidus modifiés serait souhaitable. Nous suggérons l'analyse de la molécule, par exemple, par la spectroscopie de masse et par RMN suite ou non à son clivage protéolytique (van den Hooven *et al.* 1996; van de Kamp *et al.* 1995). Comme pour la gallidermine, nous pensons que le clivage trypsique couperait la molécule entre les résidus Lys13 et dhB14 et l'analyse des deux fragments pourrait se faire par RMN (Freund *et al.* 1991). Nous suggérons aussi l'analyse en utilisant la spectrométrie de masse (fragmentation de la molécule par MS/MS) suite au traitement de la molécule à l'éthanethiol alcalin (Novak *et al.* 1996).

**B.2. Étudier le mode d'action de la mutacine B-Ny266 sur les bactéries sensibles.**

Le mode d'action principal des lantibiotiques de type A est la formation des pores dans la membrane cytoplasmique et l'altération du potentiel transmembranaire. Le mécanisme d'action peut être divisé en trois étapes: l'interaction avec la membrane, l'insertion du peptide à travers la phase lipidique et la formation des pores. Étant donné que la mutacine B-Ny266 est un lantibiotique de type A appartenant au groupe épidermine, nous pouvons supposer que son action s'exerce par la formation de pores dans la membrane cytoplasmique. Cependant, nous avons observé dans nos expériences (Mota-Meira *et al.* 1999) que les mutants résistants à la nisine demeurent sensibles à la mutacine B-Ny266 ce qui peut indiquer un mécanisme d'action différent ou une différence dans l'interaction avec les lipides membranaires. Nous proposons une étude du mode d'action de la mutacine en trois volets portant sur: l'effet de la mutacine sur l'intégrité membranaire (l'écoulement du matériel cytoplasmique et d'ions potassium et magnésium); l'effet d'un gradient de pH et du potentiel membranaire; l'interaction avec les membranes (conformation de la molécule dans les membranes

artificielles, effet de l'incorporation de la mutacine dans la bicouche lipidique et organisation moléculaire du complexe mutacine-lipide).

**B.3. Séquencer au complet l'opéron de la mutacine B-Ny266** afin de comparer les gènes de la biosynthèse, de l'immunité et de transport avec les gènes correspondants des autres lantibiotiques. Cette étude est déjà amorcée dans les laboratoires du Dr Gisèle LaPointe.

## **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abee, T., G. H. Gao et W. N. Konings.** 1991. The mechanism of action of the lantibiotic nisin in artificial membranes, p. 373-385. *In* J. Jung et H.-G. Sahl (ed.), Nisin and novel lantibiotics, ESCOM, Leiden, The Netherlands.
- Abee, T., F. M. Rombouts, J. Hugenholtz, G. Guilhard et L. Letellier.** 1994. Mode of action of nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott A grown at high and low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1962-1968.
- Amiali, M. N., C. Lacroix et R. E. Simard.** 1998. High nisin Z production by *Lactococcus lactis* UL719 in whey permeate with aeration. *World J. Microbiol. Biot.* **14**:887-894.
- Anonyme.** 1988. Nisapline - L'agent conservateur pour denrées alimentaires: caractéristiques techniques. Techn. Inf. Sheet, Aplin & Barrett Ltd. REF No. 1/88, 3 pages.
- Anonyme.** 1991. International acceptance of nisin as a food preservative. Techn. Inf. Sheet, Aplin & Barrett Ltd. REF No. 4/91/7, 4 pages.
- Benz, R., J. Jung et H.-G. Sahl.** 1991. Mechanism of channel-formation by lantibiotics in black lipid membranes, p. 359-372. *In* J. Jung et H.-G. Sahl (ed.), Nisin and novel lantibiotics, ESCOM, Leiden, The Netherlands
- Bierbaum, G., F. Götz, A. Peschel, T. Kupke, M. van de Kamp et H.-G. Sahl.** 1996. The biosynthesis of the lantibiotics epidermin, gallidermin, Pep5 and epilancin K7. *Antonie van Leeuwenhoek* **69**:119-127.
- Blackburn, P., S. J. Projan et E. B. Goldberg.** 1994. Pharmaceutical bacteriocin compositions and methods for using the same. United State Patent No: 5,304,540. Applied Microbiology, Inc., New York, NY.
- Bondi, M., R. G. Neglia, P. Messi, G. Manicardi et U. Fabio.** 1991. *Streptococcus mutans*: classification in bacteriocin-types. *Microbiologica* **14**:223-228.

- Breukink, E., C. van Kraaij, R. A. Demel, R. J. Siezen, O. P. Kuipers et B. de Kruijff.** 1997. The C-terminal region of nisin is responsible for the initial interaction of nisin with the target membrane. *Biochemistry* **36**:6968-6976.
- Brötz, H., G. Bierbaum, A. Markus, E. Molitor et H.-G. Sahl.** 1995. Mode of action of the lantibiotic mersacidin: inhibition of peptidoglycan biosynthesis via a novel mechanism. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:714-719.
- Caufield, P. W., N. K. Childers, D. N. Allen et J. B. Hansen.** 1985. Distinct bacteriocin groups correlate with different groups of *Streptococcus mutans* plasmids. *Infect. Immun.* **48**:51-56.
- Caufield, P. W., G. Shah, K. Hollingshead, M. Parrot et M. C. Lavoie.** 1990. Evidence that mutacin II production is not mediated by a 5.6-Kb plasmid in *Streptococcus mutans*. *Plasmid* **24**:110-118.
- Chikindas, M. L., J. Novak, P. W. Caufield, K. M. Schilling et J. R. Tagg.** 1997. Microbially-produced peptides having potential application to the prevention of dental caries. *Int. J. Antimicrob. Agents* **9**:95-105.
- Chikindas, M. L., J. Novak, A. J. M. Driessen, W. N. Konings, K. M. Schilling et P. W. Caufield.** 1995. Mutacin II, a bactericidal lantibiotic from *Streptococcus mutans*. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **39**:2656-2660.
- Collison, M. W., T. F. Farver, C. A. McDonald, P. J. Herald et D. J. Monticello.** 1991. Use of lanthionines for control of post-processing contamination in processed meat. United State Patent No: 5,015,487. Haarmann & Reimer Corp., Springfield, NJ.
- Crandall, A. D. et T. J. Montville.** 1998. Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:231-237.
- Dagry, M. K.** 1996. Isolement et caractérisation de mutants résistants à la mutacine B-Ny266. Mémoire de maîtrise. Université Laval, 61 pp.

- Davies, E. A. et M. R. Adams.** 1994. Resistance of *Listeria monocytogenes* to the bacteriocin nisine. *Int. J. Food Microbiol.* **21**:341-347.
- Davies, E. A., M. B. Falahee et M. R. Adams.** 1996. Involvement of the cell envelope of *Listeria monocytogenes* in the acquisition of nisin resistance. *J. Appl. Bacteriol.* **81**:139-146.
- de Vos, W. M., O. P. Kuipers, J. R. van der Meer et R. J. Siezen.** 1995. Maturation pathway of nisin and other lantibiotics: post-translationally modified antimicrobial peptides exported by Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **17**:427-437.
- de Vos, W. M., R. J. Siezen et O. P. Kuipers.** 1997. Lantibiotics similar to nisin A. United State Patent No: 5,594,103. Stichting Nederlands Instituut Voor Zuivelonderzoek (NIZO), Ede, The Netherlands.
- de Vuyst, L. et E. J. Vandamme.** 1994. Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and application, p. 151-221. *In* L. de Vuyst et E. J. Vandamme (ed.), *Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications*. Blackie Academic & Professional, London, UK.
- Delisle, A. L.** 1975. Production of bacteriocins in a liquid medium by *Streptococcus mutans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **8**:707-712.
- Delisle, A. L.** 1986. Properties of mutacin b, an antibacterial substance produced by *Streptococcus mutans* strain BHT. *Microbios* **46**:21-28.
- Delves-Broughton, J., P. Blackburn, R. E. Evans et J. Hugenholtz.** 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek* **69**:193-202.
- Doel, G et A. W. Smith.** 1993. Dentifrice compositions. International Patent WO 93/11738. SmithKline Beecham PLC, New Horizons, Court, Brentford, Middlesex, (GB).
- Driessen, A. J. M., H. W. van den Hooven, W. Kuiper, M. van de Kamp, H.-G. Sahl, R. N. H. Konings et W. N. Konings.** 1995. Mechanistic studies of lantibiotic-induced permeabilization of phospholipid vesicles. *Biochemistry* **34**:1606-1614.

**Fredenhagen, A., F. Marki, G. Fendrich, W. Marki, J. Gruner, J. van Oostrum, F. Raschdor et H. H. Peter.** 1991. Duramycin B and C, two new lanthionine-containing antibiotics as inhibitors of phospholipase A2 and structural revision of duramycin and cinnamycin, p. 131-140. *In* J. Jung et H.-G. Sahl (ed.), Nisin and novel lantibiotics, ESCOM, Leiden, The Netherlands.

**Frédéricq, P.** 1948. Actions antibiotiques reciproques chez les *Enterobacteriaceae*. *Rev. Belg. Pathol. Med. Exp.* **19** (supp. IV):1-107.

**Freund, S., G. Jung, O. Gutbrod, G. Folkers et W. A. Gibbons.** 1991. The three-dimensional solution structure of gallidermin determined by NMR-based molecular graphics, p. 91-102. *In* J. Jung et H.-G. Sahl (ed.), Nisin and novel lantibiotics, ESCOM, Leiden, The Netherlands.

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

**Fukushima, H., J. Kelstrup, S. Fukushima, T. Umemoto, A. Kaibori et H. Sagawa.** 1985. Characterization and mode of action of a purified bacteriocin from the oral bacterium *Streptococcus mutans* RM-10. *Archs. Oral Biol.* **30**:229-234.

**Gaffar, A., J. Afflitto et M. Subramanian.** 1994. Oral composition. United State Patent No: 5,368,845. Colgate Palmolive Company, Piscataway, NJ.

**Garcera, J. J. G., G. L. Elferink, J. M. Driessen et W. N. Konings.** 1993. *In vitro* pore-forming activity of the lantibiotic nisin. Role of PMF and lipid composition. *Eur. J. Biochem.* **212**:417-422.

**Gilmore, M. S., M. Skaugen et I. Nes.** 1996. *Enterococcus faecalis* cytolysin and lactocin S of *Lactobacillus sake*. *Antonie van Leeuwenhoek* **69**:129-138.



- Gootz, T. D.** 1990. Discovery and development of new antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**:13-31.
- Goulhen, F., J. Meghrous et C. Lacroix.** 1998. Characterization of nisin-resistant variants of *Pediococcus acidilactici* UL5, a producer of pediocin. *J. Appl. Microbiol.* **85**:387-397.
- Gracia, A.** 1925. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *Compt. Rend. Soc. Biol.* **93**:1040-1041.
- Gross, E., H. H. Kiltz et E. Nebelin.** 1973. Subtilin, VI, die struktur des subtilins. *H-Z. Z. Physiol. Chem.* **354**:810-812.
- Gross, E. et J. L. Morell.** 1971. The structure of nisin. *J. Am. Chem. Soc.* **93**:4634-4635.
- Hamada, S., H. Imanishi et T. Ooshima.** 1986. Isolation and mode of action of a cell-free bacteriocin (mutacin) from serotype g *Streptococcus mutans* MT3791. *Zbl. Bact. Hig. A* **261**:287-298.
- Hamada, S. et T. Ooshima.** 1975. Inhibitory spectrum of a bacteriocin-like substance (mutacin) produced by some strains of *Streptococcus mutans*. *J. Dent. Res.* **54**:140-145.
- Hamon, Y.** 1965. Revue générale: les bactériocines et substances analogues. *Pathol. Biol.* **13**:807-824.
- Hamon, Y. et Y. Péron.** 1963. Individualisation de quelques nouvelles familles d'entérobactériocines. *Compt. Rend. Soc. Biol.* **257**:309-311.
- Hancock, R. E. W.** 1997. Peptide antibiotics. *Lancet* **349**:418-422.
- Hansen, J. N.** 1996. Subtilin variant of enhanced stability and activity. United State Patent No: 5,516,682. University of Maryland, College Park, MD.
- Harlander, S. K.** 1993. Regulatory aspects of bacteriocin use, p. 233-247. *In* D. G. Hoover et L. R. Steenson (ed.), *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. Academic Press Inc., San Diego.

- Harris, L. J., H. P. Fleming et T. R. Klaenhammer.** 1992. Developments in nisin research. *Appl. Technol.* **25**:57-66.
- Havarstein, L. S., 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.
- Heidrich, C. Pag, U. M. Josten, J. Metzger, R. W. Jack, G. Bierbaum, G. Jung et H.-G. Sahl.** 1998. Isolation, characterization, and heterologous expression of the novel lantibiotic epicidin 280 and analysis of its biosynthetic gene cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3140-3146.
- Hillman, J. D., K. P. Johnson et B. I. Yaphe.** 1984. Isolation of a *Streptococcus mutans* strain producing a novel bacteriocin. *Infect. Immun.* **44**:141-144.
- Hillman, J. D., J. Novak, E. Sagura, J. A. Gutierrez, T. A. Brooks, P. J. Crowley, M. Hess, A. Azizi, K. P. Leung, D. Cvitkovitch et A. S. Bleiweis.** 1998. Genetic and biochemical analysis of mutacin 1140, a lantibiotic from *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* **66**:2743-2749.
- Hirsch, A, E. Grinsted, H. R. Chapman et A. T. R. Mattick.** 1951. A note on the inhibition of an anaerobic sporeformer in Swiss-type chesse by a nisin producing *Streptococcus*. *J. Dairy Res.* **18**:198-204.
- Howell, T. H., J. P. Fiorellini, P. Blackburn, S. J. Projan, J. de la Harpe et R. C. Williams.** 1993. The effect of a mouthrinse based on nisin, a bacteriocin, on developing plaque and gingivitis in beagle dogs. *J. Clin. Periodontol.* **20**:335-339.
- Ikeda, T., T. Iwanami, M. Hirasawa, C. Watanabe, J. R. McGhee et T. Shiota.** 1982. Purification and certain properties of a bacteriocin from *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* **35**:861-868.

- Ingram, L. C.** 1969. Synthesis of the antibiotic nisin: formation of lanthionine and  $\beta$ -methyllanthionine. *Biochim. Biophys. Acta* **184**:216-219.
- Jack, R. W et G. Jung.** 1998. Natural peptides with antimicrobial activity. *Chimia* **52**:48-55.
- Jack, R. W. et H.-G. Sahl.** 1995. Unique peptide modifications involved in the biosynthesis of lantibiotics. *Trends Biotechnol.* **13**: 269-278.
- Jack, R. W., J. R. Tagg et B. Ray.** 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* **69**:171-200.
- Jacob, F., A. Lwoff, A. Siminovitch et E. Wollman.** 1953. Définition de quelques termes relatifs à la lysogénie. *Annales de l'Institut Pasteur* **84**:222-224.
- Jarvis, B. et J. Farr.** 1971. Partial purification, specificity and mechanism of action of the nisin-inactivating enzyme from *Bacillus cereus*. *Biochim. Biophys Acta* **227**:232-240.
- Jung, G.** 1991(a). Lantibiotics: a survey, p. 1-34. *In* J. Jung et H.-G. Sahl (ed.), Nisin and novel lantibiotics, ESCOM, Leiden, The Netherlands.
- Jung, G.** 1991(b). Lantibiotics - Ribosomally synthesized biologically active polypeptides containing sulfide bridges and alfa-beta-didehydroamino acids. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **30**:1051-1192.
- Jung, G., R. Kellner, H. Zahner, F. Götz, T. Horner, R. G. Werner et H. Allgaier.** 1993. Polycyclic peptide antibiotic gallidermin. United State Patent No: 5,231,013.
- Kaiser, D., R. W. Jack et G. Jung.** 1998. Lantibiotics and microcins: novel posttranslational modifications of polypeptides. *Pure Appl. Chem.* **70**:97-104.
- Kellner, R., G. Jung, T. Horner, H. Zahner, N. Schnell, K.-D. Entian, et F. Götz.** 1988. Gallidermin: a new lanthionine-containing polypeptide antibiotic. *Eur. J. Biochem.* **177**:53-59.

- Kellner, R., G. Jung et H.-G. Sahl.** 1991. Structure elucidation of the tricyclic lantibiotic Pep5 containing eight positively charged amino acids, p. 141-158. *In* J. Jung et H.-G. Sahl (ed.), Nisin and novel lantibiotics, ESCOM, Leiden, The Netherlands.
- Kelstrup, J. et R. J. Gibbons.** 1969. Bacteriocins from human and rodent streptococci. *Archs. Oral Biol.* **14**:251-258.
- Klaenhammer, T. R.** 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**:39-86.
- Kogler, H., M. Bauch, H.-W. Fehlhaber, C. Griesinger, W. Schubert et V. Teetz.** 1991. NMR-spectroscopic investigations on mersacidin, p. 159-170. *In* J. Jung et H.-G. Sahl (ed.), Nisin and novel lantibiotics, ESCOM, Leiden, The Netherlands.
- Koller, K.-P., H.-G. Sahl et G. Bierbaum.** 1996. Recombinant mersacidin and a method for production. European Patent No: EP 0 700 998 A1. Hoechst Aktiengesellschaft, Frankfurt am Main (DE).
- Kolter, R. et F. Moreno.** 1992. Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**:141-163.
- Kordel, M. et H.-G. Sahl.** 1986. Susceptibility of bacterial, eukaryotic, and artificial membranes to the disruptive action of the cationic peptides Pep5 and nisin. *FEMS Microbiol. Lett.* **34**:139-144.
- Kuipers, O. P., G. Bierbaum, G. Ottenwälder, H. M. Dodd, J. Metzger, T. Kupke, V. Gnau, R. Bongers, P. van den Bogaard, H. Kusters, H. S. Rollema, W. M. de Vos, R. J. Siezen, G. Jung, F. Götz, H.-G. Sahl et M. J. Gasson.** 1996. Protein engineering of lantibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek* **69**:161-170.
- Kupke, T. et F. Götz.** 1996. Post-translational modifications of lantibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek* **69**:139-150.

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

**Limbert, M., D. Isert, N., Klesel, A. Markus, G. Seibert, S. Chatterjee, D. K. Chatterjee, R. H. Jani et B. N. Ganguli.** 1991. Chemotherapeutic properties of mersacidin *in vitro* and *in vivo*, p. 448-456. In J. Jung, et H.-G. Sahl (ed.), Nisin and novel lantibiotics, ESCOM, Leiden, The Netherlands.

**Liu, W. et J. N. Hansen.** 1992. Enhancement of the chemical and antimicrobial properties of subtilin by site-directed mutagenesis J. Biol. Chem. **267**:25078-25085.

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

**Maisnier-Patin, S. et J. Richard.** 1996. Cell-wall changes in nisin-resistant variants of *Listeria innocua* grown in the presence of high nisin concentration. FEMS Microbiol. Lett. **140**:29-35.

**Marsh, P. et M. Martin (ed.).** 1992. Oral microbiology. Chapman & Hall, London, UK, 249 pp.

**Mattick, A. T. R. et A. Hirsch.** 1947. Tuther observations on inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. Lancet **2**:5-7.

**Mazzotta, A. S., A. D. Crandall et T. J. Montville.** 1997. Nisin resistance in *Clostridium botulinum* spores and vegetative cells. Appl. Environ. Microbiol. **63**:2654-2659.

**Mazzotta, A. S. et T. J. Montville.** 1997. Nisin induces changes in membrane fatty acid composition of *Listeria monocytogenes* nisin-resistant strains at 10° C and 30° C. J. Appl. Microbiol. **82**:32-38.

- Mazzotta, A. S. et T. J. Montville.** 1999. Characterization of fatty acid composition, spore germination, and thermal resistance in a nisin-resistant mutant of *Clostridium botulinum* 169B and in the wild-type strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:659-664.
- McLaughlin, R. E., J. J. Ferretti et W. L. Hyles.** 1999. Nucleotide sequence of the streptococcal A-FF22 lantibiotic regulon: model for production of the lantibiotic SA-FF22 by strains of *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* **175**:171-177.
- Meghrou, J., C. Lacroix, M. Bouksaim, G. LaPointe et R. E. Simard.** 1997. Genetic and biochemical characterization of nisin Z produced by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* UL 719. *J. Appl. Microbiol.* **83**:133-138.
- Meyer, H. E., M. Heber, B. Eisermann, H. Korte, J. W. Metzger et G. Jung.** 1994. Sequence analysis of lantibiotics: chemical derivatization procedures allow a fast access to complete Edman degradation. *Anal. Biochem.* **223**:185-190.
- Minami, Y., K.-I. Yoshida, R. Azuma, A. Urakawa, T. Kawauchi et T. Otani.** 1994. Structure of cypemycin, a new peptide antibiotic. *Tetrahedron Lett.* **35**:8001-8004.
- Ming, X. et M. A. Daeschel.** 1993. Nisin resistance of foodborne bacteria and the specific resistance responses of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Food Prot.* **56**:944-948.
- Ming, X. et M. A. Daeschel.** 1995. Correlation of cellular phospholipid content with nisin resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Food Prot.* **58**:416-420.
- Miyahara, T., Y. Harada, K. Futakami, Y. Nishida et R. Konishi.** 1987. Caries-preventive composition. United State Patent No: 4,693,888. Lion Corporation, Tokyo, Japan.
- Molina y Vedia, L. M., M. J. Stutts, R. C. Boucher Jr. et D. C. Henke.** 1997. Method of treating retained pulmonary secretions. United State Patent No: 5,651,957. Molichem Medicines, Inc., Chapel Hill, NC.

- Molitor, E. et H.-G. Sahl.** 1991. Applications of nisin: a literature survey, p. 434-439. *In* G. Jung et H.-G. Sahl (ed.), Nisin and novel lantibiotics. ESCOM Leiden, The Netherlands.
- Moll, G. N., G. C. K. Roberts, W. N. Konings et A. J. M. Driessen.** 1996. Mechanism of lantibiotic-induced pore-formation. *Antonie van Leeuwenhoek* **69**:185-191.
- Morency, H. et M. C. Lavoie.** 1991. Effects of dietary carbohydrates on mutacin production and activity. *Microbios* **65**:35-46.
- Morency, H., M. Mota-Meira, D. Marion, D. Tremblay, G. LaPointe, C. Lacroix et M. C. Lavoie.** 1999. Activity of bacterial strains producing mutacins ou lantibiotics against pathogenic bacteria. Soumis.
- Morency, H., Trahan, L. et M. C. Lavoie.** 1995. Preliminary grouping of mutacins. *Can. J. Microbiol.* **41**:826-831.
- Mota-Meira, M., G. LaPointe, C. Lacroix et M. C. Lavoie.** 1996. Further characterization of mutacin B-Ny266 produced by *Streptococcus mutans*: a new lantibiotic, Abstract C46. *In* 5th symposium on Lactic Acid Bacteria, The Netherlands.
- Mota-Meira, M., G. LaPointe, C. Lacroix et M. C. Lavoie.** 1997. Purification and structure of mutacin B-Ny266: a new lantibiotic produced by *Streptococcus mutans*. *FEBS Lett.* **410**:275-279.
- Mota-Meira, M., G. LaPointe, C. Lacroix et M. C. Lavoie.** 1999. Minimum inhibitory concentrations of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens. Soumis.
- Mulders, W. M., I. J. Boerrigter, H. S. Rollema, R. J. Siezen et W. M. de Vos.** 1991. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *Eur. J. Biochem.* **201**:581-584.

- Muriana, P. M. et T. R. Klaenhammer.** 1991. Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:114-121.
- Navaratna, M. A. D. B., H.-G. Sahl et J. R. Tagg.** 1998. Two-component anti-*Staphylococcus aureus* lantibiotic activity produced by *Staphylococcus aureus* C55. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4803-4808.
- Nes, I. F. et J. R. Tagg.** 1996. Novel lantibiotics and their pre-peptides. *Antonie van Leeuwenhoek* **69**:89-97.
- Neu, H. C.** 1987. The biochemical basis of antimicrobial and bacterial resistance. *Bull. New York Acad. Med.* **63**:295-317.
- Nissen-Meyer, J., H. Holo, L. S. Havarstein, K. Sletten et I. F. Nes.** 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bacteriol.* **174**:5686-5692.
- Nissen-Meyer, J. et I. F. Nes.** 1997. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Arch. Microbiol.* **167**:67-77.
- Novak, J., G. Bourgeau, P. W. Caufield, M. Parrot, A. J. Narkates, M. Lavoie et E. J. Miller.** 1992. Biochemical analysis of a group II mutacin from *Streptococcus mutans*. No. 118919. *In* 93rd General Meeting, Atlanta, Georgia.
- Novak, J., P. W. Caufield et E. J. Miller.** 1994. Isolation and biochemical characterization of a novel lantibiotic mutacin from *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **176**:4316-4320.
- Novak, J., M. Kirk, P. W. Caufield, S. Barnes, K. Morisson et J. Baker.** 1996. Detection of modified amino acids in lantibiotic peptide mutacin II by chemical derivatization and electrospray ionization-mass spectroscopic analysis. *Anal. Biochem.* **236**:358-360.



- Ooshima, T., Y. Yasufuku, A. Izumitani, N. Sumi et T. Iwanami.** 1985. Effect of mutacin administration on *Streptococcus mutans*-induced dental caries in rats. *Microbiol. Immunol.* **29**:1163-1173.
- Ottenwälder, B., T. Kupke, S. Brecht, V. Gnau, J. Metzger, J. Jung et F. Götz.** 1995. Isolation and characterization of genetically engineered gallidermin and epidermin analogs. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3894-3903.
- Otto, M., A. Peschel et F. Götz.** 1998. Producer self-protection against the lantibiotic epidermin by the ABC transporter EpiFEG of *Staphylococcus epidermidis* Tü3298. *FEMS Microbiol. Lett.* **166**:203-211.
- Paik, S. H., A. Chakicherla et J. N. Hansen.** 1998. Identification and characterization of the structural and transporter genes for, and the chemical and biological properties of, sublancin 168, a novel lantibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *J. Biol.Chem.* **273**:23134-23142.
- Parrot, M., P. W. Caufield et M. C. Lavoie.** 1990. Preliminary characterization of four bacteriocins from *Streptococcus mutans*. *Can. J. Microbiol.* **36**:123-130.
- Paul, D. et H. D. Slade.** 1975. Production and properties of an extracellular bacteriocin from *Streptococcus mutans* bacteriocidal for group A and other Streptococci. *Infect. Immun.* **12**:1375-1385.
- Peschel, A. et F. Götz.** 1996. Analysis of the *Staphylococcus epidermidis* genes *epiF*, *E*, and *G* involved in epidermin immunity. *J. Bacteriol.* **178**:531-536.
- Peschel, A., N. Schnell, M. Hille, K.-D. Entian et F. Götz.** 1997. Secretion of the lantibiotics epidermin and gallidermin: sequence analysis of the genes *gdmT* and *gdmH*, their influence on epidermin production and their regulation by EpiQ. *Mol. Gen. Genet.* **254**:312-318.
- Pridmore, D., N. Rekhif, A.-C. Pittet, B. Suri et B. Mollet.** 1996. Variacin, a new lanthionine-containing bacteriocin produced by *Micrococcus varians*: comparison to lactacin 481 of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1799-1802.

- Qi, F., P. Chen et P. W. Caufield.** 1999(a). Functional analyses of the promoters in the lantibiotic mutacin II biosynthetic locus in *Streptococcus mutans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:652-658.
- Qi, F., P. Chen et P. W. Caufield.** 1999(b). Purification of mutacin III from group III *Streptococcus mutans* UA787 and genetic analyses of mutacin III biosynthesis genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3880-3887.
- Ray, B.** 1992. Nisin of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* as a food biopreservative, p. 207-264. In B. Ray et M. Daeschel (ed.), *Food biopreservatives of microbial origin*. CRC Press, Boca Raton.
- Reeves, P.** 1965. The Bacteriocins. *Bacteriol. Rev.* **29**:24-45.
- Rekhif, N., A. Atrih et G. Lefebvre.** 1994. Selection and properties of spontaneous mutants of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 resistant to different bacteriocins produced by lactic acid bacteria strains. *Curr. Microbiol.* **28**:237-241.
- Rogers, L. A et E. O. Whittier.** 1928. Limiting factors in lactic fermentation. *J. Bacteriol.* **16**:211-229.
- Sahl, H.-G.** 1991. Pore formation in bacterial membranes by cationic lantibiotics, p. 347-358. In J. Jung et H.-G. Sahl (ed.), *Nisin and novel lantibiotics*, ESCOM, Leiden, The Netherlands.
- Sahl, H.-G. et G. Bierbaum.** 1998. Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **52**:41-79.
- Sahl, H.-G., R. W. Jack et G. Bierbaum.** 1995. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *Eur. J. Biochem.* **230**:827-853.
- Saucier, L., A. Poon et M. E. Stiles.** 1995. Induction of bacteriocin in *Carnobacterium piscicola* LV17. *J. Appl. Bacteriol.* **78**:684-690.

- Schillinger, U., H.-S.Chung, K. Keppler et W. H. Holzapfel.** 1998. Use of bacteriocinogenic lactic acid bacteria to inhibit spontaneous nisin-resistant mutants of *Listeria monocytogenes* Scott A. J. Appl. Microbiol. **85**:657-663.
- Schmucker, R., G. Sauermann, U. Eigener et W. Engel.** 1994. Deodorizing lantibiotic cosmetic agents. United State Patent No: 5,318,778. Beiersdorf AG. Hamburg, Federal Republic of Germany.
- Schnell, N., G. Engelke, J. Augustin, R. Rosenstein, V. Ungermann, F. Götz et K.-D. Entian.** 1992. Analysis of genes involved in the biosynthesis of lantibiotic epidermin. Eur. J. Biochem. **204**:57-68.
- Schnell, N., K.-D. Entian, F. Götz, T. Hörner, R. Kellner et G. Jung.** 1989. Structural gene isolation and prepeptide sequence of gallidermin, a new lanthionine containing antibiotic. FEMS Microbiol. Lett. **58**:263-268.
- Schnell, N., K.-D. Entian, U. Schneider, F. Götz, H. Zähler, R. Kellner et G. Jung.** 1988. Prepeptide sequence of epidermin, a ribosomally synthesized antibiotic with four sulphide-rings. Nature **333**: 276-278.
- Scott, J. C., H.-G. Sahl, A. Carne et J. R. Tagg.** 1992. Lantibiotic-mediated anti-*Lactobacillus* activity of a vaginal *Staphylococcus aureus* isolate. FEMS Microbiol. Lett. **93**:97-102.
- Severina, E., A. Severin et A. Tomasz.** 1998. Antibacterial efficacy of nisin against multidrug-resistant Gram-positive pathogens. J. Antimicrob. Chemother. **41**:341-347.
- Siezen, R. J., O. P. Kuipers et W. M. de Vos.** 1996. Comparison of lantibiotic gene clusters and encoded proteins. Antonie van Leeuwenhoek **69**:171-184.
- Skaugen, M., J. Nissen-Meyer, G. Jung, S. Stevanovic, K. Sletten et I. F. Nes.** 1994. *In vivo* conversion of L-serine to D-alanine in a ribosomally synthesized polypeptide. J. Biol. Chem. **269**:27183-27185.

- Stevens, K. A., N. A. Klapes, B. W. Sheldon et T. R. Klaenhammer.** 1992. Antimicrobial action of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1786-1788.
- Stevens, K. A., B. W. Sheldon, N. A. Klapes et T. R. Klaenhammer.** 1991. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:3613-3615.
- Stoffels, G., J. Nissen-Meyer, A. Gudmundsdottir, K. Sletten, H. Holo et I. F. Nes.** 1992. Purification and characterization of a new bacteriocin isolated from a *Carnobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:417-422.
- Swaminathan, B., J. Rocourt et J. Bille.** 1995. *Listeria*, p. 341-348. *In* P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Tagg, R. J.** 1992. Bacteriocins of gram-positive bacteria: an opinion regarding their nature, nomenclature and numbers, p. 33-35. *In* R. James, C. Lazdunski et G. Patrus (ed.), *Bacteriocins, microcins and lantibiotiques*. NATO ASI Series H 65.
- Tagg, J. R. et L. V. Bannister.** 1979. "Fingerprinting"  $\beta$ -haemolytic streptococci by their production of and sensitivity to bacteriocine-like inhibitors. *J. Med. Microbiol.* **12**:397-411.
- Tagg, J. R., A. S. Dajani et L. W. Wannamaker.** 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* **40**:722-756.
- Takada, K., T. Ikeda, I. Mitsui et T. Shiota.** 1984. Mode of inhibitory action of a bacteriocin produced by *Streptococcus mutans* C3603. *Infect. Immun.* **44**:370-378.
- Taylor, S. L.** 1986(a). Nisin as an antibotulinal agent for food products. United State Patent No: 4,597,972. Aplin & Barrett, Ltd., Dorset, England.

**Taylor, S. L.** 1986(b). Antibotulinal agents for high moisture process cheese products. United State Patent No: 4,584,199. Aplin & Barrett, Ltd., Beaminster, England.

**van de Kamp, M., L. M. Horstink, H. W. van den Hooven, R. N. H. Konings, C. W. Hilbers, A. Frey, H.-G. Sahl, J. W. Metzger et F. J. M. van de Ven.** 1995. Sequence analysis by NMR spectroscopy of the peptide lantibiotic epilancin K7 from *Staphylococcus epidermidis* K7. *Eur. J. Biochem.* **227**:757-771.

**van de Ven, F. J. M. et G. Jung.** 1996. Structures of lantibiotics studied by NMR. *Antonie van Leeuwenhoek* **69**:99-107.

**van den Hooven, H. W., F. M. Lagerwerf, W. Heerma, J. Haverkamp, J.-C. Piard, C. W. Hilbers, R. J. Siezen, O. P. Kuipers et H. S. Rollema.** 1996 The structure of the lantibiotic lacticin 481 produced by *Lactococcus lactis*: location of the thioether bridges. *FEBS Lett.* **391**:317-322.

**van Kraaij, C., E. Breukink, M. A. Noordermeer, R. A. Demel, R. J. Siezen, O. P. Kuipers et B. Kruijff.** 1998. Pore formation by nisin involves translocation of its C-terminal part across the membrane. *Biochemistry* **37**:16033-16040.

**Verheul, A., N. J. Russell, R. van'T. Hof, F. M. Rombouts et T. Abee.** 1997. Modifications of membrane phospholipid composition in nisin-resistant *Listeria monocytogenes* Scott A. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3451-3457.

**Wan, J., K. Harmark, B. E. Davidson, A. J. Hillier, J. B. Gordon, A. Wilcock, M. W. Hickey et M. J. Coventry.** 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by piscicolin 126 in milk and Camembert cheese manufactured with a thermophilic starter. *J. Appl. Microbiol.* **82**:273-280.

**Werner, R. G., H. Zähler, G. Jung, H. Allgaier et U. Schneider.** 1990. Antibiotic polypeptide, process for preparing it and the use thereof. Canadian Patent No: 1,277,617.

**Whitehead, H. R.** 1933. A substance inhibiting bacterial growth by certain strains of lactic streptococci. *Biochem. J.* **27**:1793-1800.

**Winkowski, K., R. D. Ludescher et T. J. Montville.** 1996. Physicochemical characterization of the nisin-membrane interaction using liposomes derived from *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:323-327.

**Woodruff, W. A., J. Novak et P. W. Caufield.** 1998. Sequence analysis of *mutA* and *mutM* genes involved in the biosynthesis of the lantibiotic mutacin II in *Streptococcus mutans*. *Gene.* **206**:37-43.

**Zimmerman, N. et G. Jung.** 1997. The three-dimensional solution structure of the lantibiotic murein-biosynthesis-inhibitor actagardine determined by NMR. *Eur. J. Biochem.* **246**:809-819.

**Zimmerman, N., J. W. Metzger et G. Jung.** 1995. The tetracyclic lantibiotic actagardine <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR assignments and revised primary structure. *Eur. J. Biochem.* **228**:786-797.

**Zimmermann, N., S. Freund, A. Fredenhagen et G. Jung.** 1993. Solution structures of lantibiotics duramycin B and C. *Eur. J. Biochem.* **216**:419-428.