

## Caractérisation fonctionnelle d'une protéine d'intérêt de la souche bio-protectrice *Lactococcus piscium* CNCM I-4031

### Contexte :

La bio-préservation est une méthode alternative de conservation des aliments de plus en plus utilisée dans les industries alimentaires. Le principe consiste à ajouter dans la denrée alimentaire une ou des microorganismes protecteurs, capables d'inhiber le développement de flores indésirables (pathogènes ou d'altération) <sup>1</sup>. Les bactéries utilisées comme agent de bio-conservation sont majoritairement des bactéries lactiques du fait de leur innocuité et leur capacité à produire des molécules antimicrobiennes vis-à-vis des microorganismes non souhaités.

*Lactococcus piscium* CNCM I-4031 est une bactérie lactique psychrotrophe, isolée dans le cadre des travaux de recherche menés précédemment à Secalim et à EM<sup>3</sup>B (Ifremer). Cette souche modèle présente un fort intérêt pour la préservation des produits de la mer du fait qu'elle retarde leur altération sensorielle <sup>2</sup> et empêche la croissance de la bactérie altérante *Brochothrix thermosphacta* et du pathogène *Listeria monocytogenes* <sup>3,4</sup>.

Cette activité inhibitrice est considérée comme atypique car elle n'implique pas les mécanismes habituels retrouvés chez la plupart des bactéries lactiques tels que la compétition nutritionnelle, l'acidification et l'excrétion des molécules antimicrobiennes type bactériocines ou peroxyde d'hydrogène. En ce qui concerne *Lactococcus piscium* CNCM I-4031, des travaux antérieurs ont démontré que le mécanisme impliqué dans cette interaction faisait intervenir un système d'inhibition dépendant du contact cellulaire. L'effet antagoniste n'est observé que lorsque les cellules de *L. piscium* atteignent un certain niveau de concentration et qu'elles sont en contact direct avec celles de *L. monocytogenes* <sup>5</sup>.

Une étude récente du surfacéome et du transcriptome de *L. piscium* en conditions d'interactions avec *L. monocytogenes*, a permis de mettre en évidence l'implication potentielle d'une protéine de surface dans ce mécanisme d'inhibition. C'est une protéine modulaire identifiée comme étant une peptidoglycane (PG) hydrolase composée d'un domaine d'ancrage à la paroi bactérienne de type LysM et un motif catalytique lysozyme-like <sup>6</sup>. Les PG hydrolases qui comportent ce motif sont capables de cliver les liaisons glycosidiques  $\beta$  (1-4) entre les résidus acide N-acétyl-D-muramique et N-acétyl-D-glucosamine présents dans la paroi bactérienne. En général, les fonctions physiologiques de ces enzymes incluent la régulation de la croissance de la paroi bactérienne, le turnover des peptidoglycans, la séparation des cellules sœurs pendant la division cellulaire et l'autolyse<sup>7</sup>. Elles sont aussi à l'origine de la lyse bactérienne observée dans le cannibalisme et de l'allolyse qui font référence à la mise à mort de cellules génétiquement identiques récemment documentée chez deux espèces Gram-positives, *Bacillus subtilis* et *Streptococcus pneumoniae*, respectivement <sup>7,8</sup>. L'ensemble de ces informations suggèrent que la PG hydrolase (SCA91317.1) identifiée chez *L. piscium* jouerait potentiellement un rôle dans le mécanisme d'inhibition par contact en entraînant la rupture de la paroi de *L. monocytogenes*.

A ce jour, aucun des mécanismes décrits ci-dessus fait intervenir la notion de contact cellulaire et la peptidoglycane hydrolase n'a jamais été montrée comme étant impliquée dans l'inhibition des microorganismes pathogènes par des bactéries lactiques.

**Objectif :** Nous proposons à un(e) étudiant(e) motivé(e) de participer à la caractérisation fonctionnelle de la PG hydrolase (SCA91317.1) identifiée chez *L. piscium* CNCM I-4031 et d'évaluer son potentiel d'inhibition contre *L. monocytogenes* et *B. thermosphacta*.

**Le travail consistera à :**

- Produire la PG hydrolase recombinante chez *Escherichia coli*: Mettre au point le clonage du domaine catalytique, la surproduction et la purification.
- Evaluer l'activité enzymatique de la PG hydrolase recombinante par la technique du zymogramme et tester son potentiel antimicrobien sur des bactéries cibles.

Selon l'avancée du projet, l'étudiant(e) pourra également être amené(e) à effectuer l'inactivation du gène codant pour PG hydrolase chez *L. piscium* CNCM I-403 et de caractériser le mutant généré (morphologie, croissance et activité d'inhibition).

**Principales techniques à mettre en œuvre :** Microbiologie classique, expression et purification des protéines recombinantes, zymogramme et mutagenèse dirigée.

**Encadrant :** Raouf Tareb & Marie-France Pilet

**Dossier de candidature :** CV et lettre de motivation

**Contact :** [raouf.tareb@oniris-nates.fr](mailto:raouf.tareb@oniris-nates.fr) / [Marie-France.Pilet@inra.fr](mailto:Marie-France.Pilet@inra.fr)

**Référence bibliographique:**

1. Zagorec, M., Champomier-Verges, M.-C., Chaillou, S., Leroy, S. & Christieans, S. La connaissance approfondie des communautés bactériennes des aliments et ses conséquences pour l'utilisation de la biopréservation. *Innov. Agron.* (44), 15-24. (2015).
2. Matamoros, S. *et al.* Psychrotrophic lactic acid bacteria used to improve the safety and quality of vacuum-packaged cooked and peeled tropical shrimp and cold-smoked salmon. *J. Food Prot.* **72**, 365–74 (2009).
3. Fall, P. A., Leroi, F., Cardinal, M., Chevalier, F. & Pilet, M. F. Inhibition of *Brochothrix thermosphacta* and sensory improvement of tropical peeled cooked shrimp by *Lactococcus piscium* CNCM I-4031. *Lett. Appl. Microbiol.* **50**, 357–361 (2010).
4. Fall, P. A., Leroi, F., Chevalier, F., Guérin, C. & Pilet, M.-F. Protective Effect of a Non-Bacteriocinogenic *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 Strain Against *Listeria monocytogenes* in Sterilized Tropical Cooked Peeled Shrimp. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* **19**, 84–92 (2010).
5. Saraoui, T. *et al.* Inhibition mechanism of *Listeria monocytogenes* by a bioprotective bacteria *Lactococcus piscium* CNCM I-4031. *Food Microbiol.* **53**, 70–78 (2016).
6. Tareb, R., Monnet, V., Haudebourg, E., Saraoui, T., Leroi, F., Delbarre Ladrat, Christine., Passerini, D., Bjorkroth, J., Hultman J, Marche, L., Zagorec, M., Pilet, MF. Study of the inhibition mechanism of the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes* by *Lactococcus piscium* using proteomic and transcriptomic approaches. FoodMicro Conference 2018 - 26th International ICFMH Conference. September 3rd – 6th 2018, Freie Universität Berlin, Germany (2018).
7. Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P. & Foster, S. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 259–286 (2008).
8. Claverys, J.-P. & Håvarstein, L. S. Cannibalism and fratricide: mechanisms and raisons d'être. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 219–229 (2007).