



Université Claude Bernard



DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **14 décembre 2022**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **Monsieur AZARI ANPAR Mojtaba**

Titre de la thèse : « *Etude des interactions d'exopolysaccharides de bactéries lactiques avec une bactériocine ou une toxine bactérienne* »

Résumé



Les propriétés des polysaccharides conditionnent la texture de nombreux aliments. L'intérêt croissant pour les exopolysaccharides (EPS) des bactéries lactiques (LAB) résulte notamment de la possibilité de les produire *in situ* dans l'aliment, à la différence des polysaccharides végétaux ou d'algues (ex : pectine, alginate). Avec la tendance du « clean label », les LAB sont des ingrédients (ferments) alors que la pectine ou de l'alginate de sodium sont des additifs alimentaires. Si de nombreuses études portent sur les propriétés techno-fonctionnelles des EPS résultant de leur interaction avec les principaux constituants des aliments, celles sur leurs interactions avec des molécules bioactives restent rares. Ce travail a donc visé à étudier les interactions entre un jeu de polysaccharides, comprenant des EPS, et la nisine Z, un peptide antibactérien produit par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, ou le pentamère de l'entérotoxine B thermolabile d'*Escherichia coli* (LTB). L'entérotoxine thermolabile d'*E. coli* est une protéine composée d'une simple sous-unité A avec une activité catalytique et de la sous-unité B (LTB) non toxique, qui interagit avec un récepteur des cellules cibles permettant son internalisation.

Le jeu d'EPS comprenait des dextranes de *Leuconostoc mesenteroides* de poids moléculaire faible (9-11 kDa) ou intermédiaire (60-76 kDa), des EPS de *Ln. mesenteroides* P35 et 2 kéfiranes (extraits de grains de kéfir de lait commercialisés par Crokfun ou Kefiralia). Les EPS de *Ln. mesenteroides* P35 sont des dextranes de haut poids moléculaire (M_w estimé à $9,9 \times 10^3$ kDa) avec 90 % de liaisons α -(1→6) et 10% de liaisons de branchement α -(1→3) entre molécules de glucose, alors que les deux kéfiranes sont des hétéropolysaccharides de glucose et de galactose.

L'étude de l'effet de chacun de ces EPS, de pectine d'agrumes hautement méthylée et d'alginate de sodium (à 1g.L^{-1} dans du bouillon tryptone-soja) sur l'activité antibactérienne de la nisine Z a indiqué que seul ce dernier diminuait son activité (multiplication par 4 des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides vis-à-vis de *Listeria innocua* ATCC 33090 et *Kocuria rhizophila* ATCC 9341). Les potentiels zeta (ζ) à pH 7 de la nisine Z, des 2 souches de bactéries sensibles à la nisine et des

polysaccharides ont été déterminés : seule la nisine Z a un potentiel ζ légèrement positif, tandis que ceux des bactéries, de l'alginate de sodium et de la pectine d'agrumes étaient tous inférieurs à -20 mV et ceux des EPS tous compris entre 0 et -10 mV. Il a donc été proposé que l'alginate de sodium, seul polymère anionique à présenter un potentiel ζ plus faible que les 2 bactéries sensibles à la nisine, forme des complexes par interactions électrostatiques avec la nisine Z dont la charge nette est positive, diminuant ainsi la quantité de nisine Z "libre" interagissant avec ces bactéries. Cette hypothèse a été confortée par l'observation à pH 7 de la formation d'agrégats de nisine Z et d'alginate et par l'estimation de l'affinité de l'alginate pour la nisine Z "libre" ou immobilisée (par résonance plasmonique de surface (SPR)).

Tout comme la nisine Z, la LTB a été immobilisée sur un capteur à puce d' amino carboxyméthyl dextran, permettant d'évaluer par SPR ses interactions avec les polysaccharides. La constante apparente d'affinité des EPS de *Ln. mesenteroides* P35 pour la LTB immobilisée ($K_{Aapp} = (2,05 \pm 0.04) \times 10^6 \text{ mol.L}^{-1}$ à 37°C) s'est avérée élevée. L'interaction a été spontanée ($\Delta G < 0$), endothermique ($\Delta H > 0$), et accompagnée d'une augmentation de l'entropie ($\Delta S > 0$). L'augmentation avec la température de K_{Aapp} suggère des interactions EPS - LTB à dominante hydrophobe. L'analyse *in silico* par « docking » moléculaire des interactions LTB - EPS de *Ln. mesenteroides* P35 a permis de proposer des interactions moléculaires putatives impliquées. Ceci suggère que certains EPS de LAB, comme ceux de *Ln. mesenteroides* P35 EPS, pourraient inhiber l'activité de la toxine thermolabile d'*E. coli*.

Enfin, lors de la réalisation de ces analyses, nous avons relevé que les souris hétérozygotes pour la *Tnx* présentaient également un phénotype, pouvant parfois être plus sévère que celui des souris homozygotes déficientes. Potentiellement, ces souris pourraient donc être un bon modèle pour le sous-type de SED hypermobile causé par des mutations à l'état hétérozygote dans le gène *TNXB*.

En conclusion, ces travaux de recherche nous ont permis de décrypter plus en profondeur les caractéristiques du modèle murin déficient en *Tnx*, de mettre en évidence l'implication de la glycoprotéine dans les fonctions neurovasculaires cutanées et d'apporter plus d'éléments de réponse quant à son rôle au sein de la matrice extracellulaire.