In vitro assessment of the probiotic properties and bacteriocinogenic potential of Pediococcus pentosaceus MZF16, isolated from artisanal Tunisian meat « Dried Ossban »

Mohamed Zommiti, Emeline Bouffartigues, Khaled Sebei, Marc Feuilloley, Mounir Ferchichi and Nathalie Connil

Unité de Protéomique Fonctionnelle et Potentiel Nutraceutique de la Biodiversité de Tunisie, Université de Tunis El- Manar, Tunis, (Tunisia)
Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement (LMSM) EA 4312, Université de Rouen, Évreux, (France)
Déclaration de conflit d’intérêt

Pour cette présentation, je déclare n’avoir aucun conflit d’intérêt.
Le genre *Pediococcus*

Bactérie à Gram positif, homofermentaire
Groupe des Bactéries lactiques
Proche du genre *Lactobacillus* (%G-C faible)

Espèces :
- *P. acidilactici*
- *P. cellicola*
- *P. clausenii*
- *P. damnosus*
- *P. ethanolidurans*
- *P. inopinatus*
- *P. parvulus*
- *P. pentosaceus*
- *P. stilesii*

(Schleifer a Ludwig, *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, 1999)
Habitat

*Pediococci*
Isolés de sources variées (sol, plant, saucisse, épices, fromage, vin…)

Utilisés comme starter en industrie alimentaire pour la fermentation des végétaux (ensilage, choucroute) et fermentation des produits carnés (saucisses)

Effets probiotiques

*Pediococcus acidilactici MA 18/5M*
=1er ferment lactique probiotique autorisé en Union Européenne comme additif en nutrition animale, contenant la bactérie vivante.
Utilisation en aquaculture pour l’élevage des crevettes et des poissons et comme eau de boisson à destination des porcelets sevrés, porcs charcutiers, poules pondeuses et poulets de chair

Lutte contre les virus, les pathogènes, traitement des diarrhées.

Peu d’études chez l’homme *Pediococcus pentosaceus SB83* proposé comme probiotique vaginal.

Statut GRAS (generally recognized as safe)
Mais quelques cas d’infections
| Contexte de l’étude | Résultats expérimentaux | Conclusion |
|--------------------|-------------------------|------------|

*In vitro* assessment of the probiotic properties and bacteriocinogenic potential of *Pediococcus pentosaceus* MZF16, isolated from artisanal Tunisian meat « Dried Ossban »

Viande séchée
Tests sur la bactérie

*Pediococcus pentosaceus* MZF16

**Contexte de l'étude**

**Résultats expérimentaux**

**Conclusion**

Activité antimicrobienne  
Autoaggregation hydrophobicité  
Présence de gènes de virulence  
Mesure de biofilm (coloration cristal violet)  
Sensibilité aux antibiotiques  
Resistance pH et sels biliaires
**Pediococcus pentosaceus MZF16**

**Tests sur la bactérie**

- Activité antimicrobienne
- Autoaggregation hydrophobicité
- Resistance pH et sels biliaires
- Sensibilité aux antibiotiques

**Tests sur cellules eucaryotes**

- Test de cytotoxicité/viabilité
- Dosage IL8 (inflammation)
- Mesure de résistance (perméabilité)
- Cellules Caco-2/TC7 non différenciées
- Mesure de biofilm (coloration cristal violet)
- Cellules Caco-2/TC7 différenciées (inserts)
- Présence de gènes de virulence

**Contexte de l’étude**

**Résultats expérimentaux**

**Conclusion**

Tests sur cellules eucaryotes
Pourcentage d’hydrophobicité élevée (adhésion au xylène)
Forte autoagréation (89%)
Pourcentage d’hydrophobicité élevée (adhésion au xylène)
Forte autoagréation (89%)
Pourcentage d’hydrophobicité élevée (adhésion au xylène)
Forte autoaggrégation (89%)

Adhésion aux cellules Caco-2/TC7
Formation modérée de biofilms
Résistance à l’acidité et aux sels biliaires

→ Capacité de *Pediococcus pentosaceus* MZF16 à coloniser le tractus gastrointestinal
Pas d’activité hémolytique sur gélose au sang
Pas d’activité hémolytique sur gélose au sang

Pas de cytotoxicité sur cellules Caco-2/TC7
**Contexte de l’étude**

**Résultats expérimentaux**

Pas d’activité hémolytique sur gélose au sang

Stimulation non significative de la sécrétion IL-8 des cellules Caco-2/TC7

Pas de cytotoxicité sur cellules Caco-2/TC7

**Conclusion**
**Passage de l’étude**

**Résultats expérimentaux**

*Pas d’activité hémolytique sur gélose au sang*

*Pas de cytotoxicité sur cellules Caco-2/TC7*

*Stimulation non significative de la sécrétion IL-8 des cellules Caco-2/TC7*

*Augmentation de la résistance transepithéliale (TEER) des cellules Caco-2/TC7 différenciées sur inserts*
Effect benefique de *Pediococcus pentosaceus* MZF16 sur l’intestin

**Contexte de l’étude**

Pas d’activité hémolytique sur gélose au sang

Pas de cytotoxicité sur cellules Caco-2/TC7

**Résultats expérimentaux**

- **Stimulation non significative de la sécrétion IL-8 des cellules Caco-2/TC7**

- **Augmentation de la résistance transepithéliale (TEER) des cellules Caco-2/TC7 différenciées sur inserts**

**Conclusion**

Effet bénéfique de *Pediococcus pentosaceus* MZF16 sur l’intestin
Activité antimicrobienne de *Pediococcus pentosaceus* MZF16

| Indicator strains | Inhibition zone (mm)* of MZF16 |
|-------------------|---------------------------------|
|                   | Non-treated CFCS | Neutralized at pH 6.5 | Protease K | Heat treatment |
| *L. innocua* HBP13| +++               | ++                    | -          | ++            |
| *L. monocytogenes* CIP 55143 | +++ | ++ | - | ++ |
| *E. faecalis* ATCC 29212 | +++ | +++ | - | ++ |
| *P. aerugiosa* PAO1 | ++ | ++ | - | + |
| *P. pentosaceus* MZF16 | - | - | - | - |

* - No inhibition zone, + < 3 mm, ++ 3–6 mm, +++ radius inhibit zone>6 mm
Activité antimicrobienne de *Pediococcus pentosaceus* MZF16

| Indicator strains      | Inhibition zone (mm)* of MZF16 |
|------------------------|---------------------------------|
|                        | Non-treated CFCS | Neutralized at pH 6.5 | Proteinase K | Heat treatment |
| *L. innocua* HB13      | +++               | ++                    | -            | ++            |
| *L. monocytogenes* CIP 55143 | +++               | ++                    | -            | ++            |
| *E. faecalis* ATCC 29212 | +++               | +++                   | -            | ++            |
| *P. aeruginosa* PAO1    | ++                | ++                    | -            | +             |
| *P. pentosaceus* MZF16  | -                 | -                     | -            | -             |

* - No inhibition zone, + < 3 mm, ++ 3–6 mm, +++ radius inhibit zone>6 mm

*Pediococcus pentosaceus* MZF16 est active contre *Listeria monocytogenes* CIP 55143.
Traitement à la proteinase K : perte d’activité
Substance inhibitrice = bactériocine

→ Pediocine MZF16
| Contexte de l’étude | Résultats expérimentaux | Conclusion |
|---------------------|-------------------------|------------|

Etude de la pediocine MZF6 par amplification PCR à l’aide des amorces P1 et P2 construites pour amplifier l’opéron de la pediocine PA-1 chez *P. acidilactici* PAC 1.0. (Marrug et al., 1992)

→ Séquençage de l’amplicon
Etude de la pédiochine MZF6 par amplification PCR à l’aide des amorces P1 et P2 construites pour amplifier l’opéron de la pédiochine PA-1 chez *P. acidilactici* PAC 1.0. (Marrug et al., 1992)

**Séquençage de l’amplicon**

Résultat du séquençage
Organisation chromosomique similaire à celle de *P. acidilactici*
-presence du gène *pedA* qui code pour la pédiochine MZF16 putative
-gène *pedB* qui code pour la protéine d’immunité putative
Etude de la pédiocine MZF6 par amplification PCR à l’aide des amorces P1 et P2 construites pour amplifier l’opéron de la pédiocine PA-1 chez *P. acidilactici* PAC 1.0. (Marrug et al., 1992)

Séquençage de l’amplicon

**Résultats expérimentaux**

**Résultat du séquençage**

Organisation chromosomique similaire à celle de *P. acidilactici* - présence du gène *pedA* qui code pour la pédiocine MZF16 putative - gène *pedB* qui code pour la protéine d’immunité putative

**Traduction de PedA en acides aminés en utilisant BlastX.**

Pédiocine MZF16 putative possède le motif *YGNGV* des bactériocines de classe IIA, responsable de l’activité anti-*Listeria*.

Pédiocine MZF16 : **100% identique avec coaguline A de Bacillus coagulans**, et comprend un acide aminé différent comparé à la pédiocine PA-1 de *P. acidilactici* PAC 1.0 (T à la place de N).
In vitro assessment of the probiotic properties and bacteriocinogenic potential of *Pediococcus pentosaceus* MZF16, isolated from artisanal Tunisian meat « Dried Ossban »

**Conclusion**

- Capacité à coloniser le tractus gastrointestinal (hydrophobicité, autoaggregation, adhesion)
- Absence de cytotoxicité
- Effet bénéfique sur l’intestin (↑ TEER, stimulation de la barrière intestinale)
- Absence de gènes de virulence et gènes de résistance aux antibiotiques
- Activité anti-*Listeria*
- Pediocine MZF6 (nouvelle pediocine 100% identique à la coaguline A)
In vitro assessment of the probiotic properties and bacteriocinogenic potential of *Pediococcus pentosaceus* MZF16, isolated from artisanal Tunisian meat « Dried Ossban »

**Conclusion**

- Capacité à coloniser le tractus gastrointestinal (hydrophobicité, autoaggregation, adhesion)
- Absence de cytotoxicité
- Effet bénéfique sur l’intestin (TEER, stimulation de la barrière intestinale)
- Absence de gènes de virulence et gènes de résistance aux antibiotiques
- Activité anti-*Listeria*
- Pediocine MZF6 (nouvelle pediocine 100% identique à la coaguline A)

**Perspectives**

- Tests virulence de *P. pentosaceus* MZF16 sur modèles *in vivo*<br>  - *Caenorhabditis elegans*<br>  - souris
- Essai antagonisme anti-*Listeria* sur modèles cellulaires
- Etude du comportement de *P. pentosaceus* MZF6 dans les produits carnés et laitiers
Remerciements

Tous les membres du LMSM
Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement
Université de Rouen, France

Collaborateurs

Dr Mounir Ferchichi
Unité de Protéomique Fonctionnelle et Potentiel Nutraceutique
de la Biodiversité de Tunisie, Institut Supérieur des Sciences
Biologiques Appliquées de Tunis (ISSBAT), Université de Tunis El-
Manar, Tunisie.

Mohamed Zommiti
Doctorant ISSBAT
Merci de votre attention

Dr Nathalie Connil
Maitre de Conférences-HDR
Laboratoire de microbiologie, signaux et microenvironnement
Université de Rouen/Evreux (France)