

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Djilali Bounaama Khemis Miliana



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la terre
Département de biologie

Mémoire de Fin de d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie appliquée

Thème

Pouvoir inhibiteur et résistance au stress chez les bactéries lactiques

Présenté et soutenu par :

**BOUNEDJAR IKRAM
BENAOUDA MOUNIRA**

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme Saadi F	MCB	Université Djilali Bounaama
Rapporteur : Mme Kalbaza K	MAB	Université Djilali Bounaama
Examinatrice : Mme Ouazib M	MCB	Université Djilali Bounaama

Année universitaire
2019- 2020

Remerciement

« Louange à Allah qui nous a guidés à ceci. Nous n'aurions pas été guidés, si Allah ne nous avait pas guidés »

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu voir le jour sans l'aide et l'encadrement de Mme.Kalbaza Khadidja . Un remerciement particulier et sincère pour tous vos efforts fournis. Ainsi, pour vos conseils précieux et vos orientations scientifiques, Votre amabilité, votre sérieux, votre compétence, et surtout vos qualités humaines nous ont beaucoup marqué, vous avez toujours réservé un bon accueil malgré vos obligations professionnelles.

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à Mme Saadi et Mme Ouazib d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nos remerciements s'adressent aussi aux responsables du laboratoire de Microbiologie de l'Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana.

Enfin nous remercions tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail, qu'ils trouvent l'expression de mes profonds gratitude et respects.

Dédicace

Merci mon **DIEU** de m' avoir permis d' arriver jusqu' ici et de m' avoir donné
l' aptitude d' achever ce modeste travail.

Je dédie se travail :

À la femme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et la source de joie et
du bonheur, la flamme de mon cœur, celle qui s' est toujours sacrifiée pour me voir
réussir, que Dieu la garde pour moi, ma chère mère **Nadia** ♥♥

À mon cher grand-père♥♥

Mihailia Abd el-Kader, que dieu l' accueille dans son vaste paradis.

À ma cher grand-mère♥♥

Aicha, que dieu te donne une long vie et la santé .

À mes très chères sœurs ♥♥

Amina , Khadidja

En témoignage de l' attachement, de l' amour et de l' affection que je porte pour
vous. Je vous dédie ce travail avec tous mes voeux de bonheur et de santé.

À mes chères tantes ♥

Saliha , Nabila , Nour el houda , Fatima zohra

À mon seul cher oncle ♥ **Ahmed**

À mon **mari**, qui m' a soutenu durant toute la durée de réalisation de ce travail.

À mes chères ami(e)s ♥

À mes collègues ♥

Qui m' ont aidé durant toute ma vie étudiante, et à ceux qui m' ont aidé de près ou
de loin.

Mounira

Dédicace

♥*Je dédie ce modeste travail*♥

En premier lieu à mes chers parents Sources de ma joie et le secret de ma force.

♥*Ma très chère mère Mme. ♥Redaouia fatima.♥*

Que ce travail soit pour toi le témoignage de mon infinie reconnaissance, pour ton aide précieuse et toutes ces années de compréhension.

♥*Mon très cher père Mr. ♥Bounedjar Abdallah.♥*

Tu es un pilier solide et incontournable pour ma personne et mon parcours, que Dieu te donne santé et te garde pour nous toute la vie.

♥*À mon chers frère et mes chères sœurs.♥*

Je vous exprime à travers ce travail mes sentiments de Fraternité et d'amour♥♥

À mes neveux et mes nièces qui illuminent mes journées en toutes circonstances.

À tous les membres de ma famille sans exception

♥*À Mon âme, mes puces, mes chres Mounib et Naïme♥.*

♥*À ma chère copine Hadjer♥*

♥*À My Best Friend EVER pour ses encouragements*

*À tous ceux que je porte dans mon coeur qui me sont chers et proches.♥
mon infinie reconnaissance.*

Ikram

Résumé

La présence des bactéries lactiques, peut assurer, d'une part, le bon déroulement des étapes de production d'un aliment fermenté, ses qualités organoleptiques, et d'autre part, sa conservation naturelle (ou bio-conservation), en réduisant ou éliminant l'addition des conservateurs chimiques et en les remplaçant par d'autres qui sont naturels.

Les bactéries lactiques sont utilisées dans la fermentation et la bio-conservation des aliments grâce à leur capacité de produire des acides organiques et d'autres substances antimicrobiennes telles que les bactériocines qui inhibent certaines souches pathogènes. Nous avons étudié le pouvoir antimicrobien des bactéries lactiques par production de substances telles que les acides organiques (acide lactique et acide acétique), le diacétyle, le peroxyde d'hydrogène, le CO₂ et les bactériocines. Ces substances antimicrobiennes, spécifiques des bactéries lactiques sont exploitées dans la bio-préservation des nourritures, comme produits pharmaceutiques (contre certaines mammites) et parapharmaceutiques.

Nous avons aussi étudié l'adaptation aux variations environnementales, qui est essentielle pour la survie et le développement des bactéries lactiques, Les effets engendrés par le stress tout en élucidant les mécanismes de réponse au stress.

Mot clés : Bactéries lactique, substances antimicrobiennes, bactériocines, bio-préservation, stress.

المخلص

يمكن أن يضمن وجود بكتيريا حمض اللبن ، من ناحية ، السير السلس لمراسل إنتاج الطعام المخمر ، وخصائصه الحسية ، ومن ناحية أخرى ، الحفاظ على الطبيعة (أو الحفاظ البيولوجي) ، من خلال تقليل أو القضاء على إضافة المواد الحافظة الكيميائية واستبدالها بأخرى طبيعية.

تستخدم بكتيريا حمض اللاكتيك في التخمير والحفظ البيولوجي للأطعمة نظرًا لقدرتها على إنتاج الأحماض العضوية والمواد المضادة للميكروبات الأخرى مثل البكتيريوسينات التي تثبط بعض السلالات المسببة للأمراض. لقد درسنا قدرة بكتيريا حمض اللبن على التصدي للميكروبات عن طريق إنتاج مواد مثل الأحماض العضوية (حمض اللاكتيك وحمض الخل) ، ثنائي الأسيتيل ، بيروكسيد الهيدروجين ، ثاني أكسيد الكربون والبكتيريوسينات. تُستخدم هذه المواد المضادة للميكروبات في الحفظ البيولوجي للأطعمة ، كمنتجات صيدلانية (ضد بعض أنواع التهاب الزرع) وكمستحضرات صيدلانية.

لقد درسنا أيضًا التكيف مع التغيرات البيئية ، وهو أمر ضروري لبقاء وتطور بكتيريا حمض اللبن ، وتأثيرات الإجهاد مع توضيح آليات الاستجابة للإجهاد.

كلمات مفتاحية : بكتيريا حمض اللبن، المواد المضادة للميكروبات ، البكتيريوسينات ، الحفظ الحيوي ، الإجهاد

Abstract

The presence of lactic acid bacteria can ensure, on the one hand, the smooth running of the stages of production of a fermented food, its organoleptic qualities, and on the other hand, its natural preservation (or bio-preservation), by reducing or eliminating the addition of chemical preservatives and replacing them with others that are natural.

Lactic acid bacteria are used in the fermentation and bio-preservation of foods due to their ability to produce organic acids and other antimicrobial substances such as bacteriocins which inhibit some pathogenic strains. We have studied the antimicrobial power of lactic acid bacteria by producing substances such as organic acids (lactic acid and acetic acid), diacetyl, hydrogen peroxide, CO₂ and bacteriocins. These antimicrobial substances, specific for lactic acid bacteria, are used in the bio-preservation of foods, as pharmaceutical products (against certain mastitis) and parapharmaceuticals.

We have also studied adaptation to environmental variations, which is essential for the survival and development of lactic acid bacteria, the effects of stress while elucidating the mechanisms of stress response.

Key words: Lactic acid bacteria, Antimicrobial substances, bacteriocins, biopreservation, stress.

Sommaire

Introduction :	1
1. Chapitre 1 : Généralités sur les bactéries lactiques	1
1.1. Présentation des bactéries lactiques	3
1.2. Habitat et origine des bactéries lactiques	3
1.3. Taxonomie des bactéries lactiques	3
1.4. Caractéristiques des principaux genres de bactéries lactiques	7
1.4.1. <i>Enterococcus</i>	7
1.4.2. <i>Lactobacillus</i>	7
1.4.3. <i>Lactococcus</i>	9
1.4.4. <i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> et <i>Weissella</i>	10
1.4.5. <i>Pediococcus</i> et <i>Tetragenococcus</i>	11
1.4.6. <i>Streptococcus</i>	11
1.4.7. <i>Bifidobacterium</i>	12
1.5. Métabolisme des bactéries lactiques	13
1.5.1. Principales voies fermentaires des bactéries lactiques	13
1.5.1.1. Voie homofermentaire (EMP) ou la glycolyse	13
1.5.1.2. Voie hétérofermentaire	14
1.6. Intérêt des bactéries lactiques	16
1.6.1. Rôle des bactéries lactiques dans le domaine thérapeutique	16
1.6.2. Rôle des bactéries lactiques dans l'industrie alimentaire	16
1.6.3. Rôle des bactéries lactique dans la bioconservation et la biopréservation	17
2. Chapitre 2 : Pouvoir inhibiteur des bactéries lactiques	18
2.1. Substances inhibitrices produites par les bactéries lactiques	19
2.1.1. Acides organiques	19
2.1.2. Acides gras	19
2.1.3. Peroxyde d'hydrogène	20
2.1.4. Dioxyde de carbone	20
2.1.5. Diacétyle	20
2.1.6. Reutérine	20
2.1.7. Acétaldéhyde	21
2.1.8. Bactériocines	21
2.2. Limites d'utilisation des bactériocines	24

2.3.	Conditionnement des bactériocines	24
2.4.	Applications des bactériocines	25
2.4.1.	Bactériocines en agroalimentaire	25
2.4.1.1.	Propriétés des bactériocines pour une application alimentaire	25
2.4.1.2.	Applications des bactériocines dans le secteur alimentaire	25
2.4.2.	Applications médicales des bactériocines	26
3.	Chapitre 3 : Le stress chez les bactéries lactiques.....	27
3.1.	Comment étudier un stress ?.....	34
3.2.	Définition du stress	34
3.3.	Modalité d'application du stress	35
3.3.1.	Stress prolongé	35
3.3.2.	Stress de type choc	35
3.4.	Effet du stress sur les bactéries	36
3.4.1.	Effet sur la croissance, la survie et la morphologie	36
3.5.	Stress osmotique	36
3.5.1.	Osmose et stress osmotique	36
3.5.2.	Effets de stress osmotique sur les bactéries lactiques	37
3.6.	Stress thermique	37
3.6.1.	Adaptation à une élévation de température	38
3.6.2.	Adaptation à un choc froid	38
3.7.	Stress acide	38
3.7.1.	Effet de stress acide sur les bactéries lactiques	39
	Conclusion.....	40
	Références bibliographiques.....	42

Liste des figures

Figure 1 : Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés.....	5
Figure2 : <i>Enterococcus faecalis</i> observé au microscope électronique.....	7
Figure3 : <i>Lactobacillus casei</i> observé au microscope électronique.....	8
Figure4 : <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> observé au microscope électronique.....	9
Figure5 : <i>Leuconostoc mesenteroides</i> observé au microscope électronique.....	10
Figure6 : <i>Pediococcus</i> observé au microscope électronique.....	11
Figure7 : <i>Streptococcus thermophilus</i> , observé au microscope électronique.....	12
Figure8 : <i>Bifidobacterium</i> sp observé au microscope électronique.....	13
Figure9 : Représentation schématique des principales voies de fermentation des bactéries lactiques.....	15
Figure10 : Séquence et structure de lantibiotiques de type A (Nisine), B (Mersacidine) et d'un lantibiotique « two-peptides »	23

Liste des tableaux

Tableau 1 : Différents genres des bactéries lactiques d'intérêt en microbiologie des aliments et leurs principales caractéristiques.....5

Tableau2 : Classification des bactériocines des bactéries lactiques.....22

Liste des abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique.

ARN: Acide ribonucléique.

ARNr: Acide ribonucléique ribosomique.

BL : Bactéries lactique.

CO₂: Dioxyde de carbone.

DHAP: Dihydroxyacétone phosphate.

DO: Densité optique.

EMP: Embden-Meyerhof-Parnas.

En : *Entérocooccus*.

FBA: Fructose-1,6-Biphosphate Aldolase.

FBP: fructose1-6 biphosphate.

GAP: Glycéraldéhyde phosphate.

G+C : Guanine et Cytosine. **G :** Gramme.

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène.

Lb : *Lactobacillus*.

Lc : *Lactococcus*.

NaCl : Chlorure de sodium.

NAD⁺ : Nicotinamide adenine dinucléotide.

NADH⁺ : couple oxydant/réducteur .

pH :Potentiel hydrogène.

St. : *Streptococcus*.

Spp : sous Espèce.

Ln : *Leuconostoc*.

°C: Degré celsius.

% : pour cent.

Introduction :

Depuis des millénaires, les aliments fermentés font partie du menu des hommes, qui apprécient leurs propriétés gustatives et sanitaires et leur longue durée de conservation. Les bactéries lactiques sont des microorganismes très répandues dans la nature, on les trouve dans le sol, sur les végétaux. Ils sont largement utilisés dans l'industrie alimentaire, en tant que starters dans les procédés de fermentations afin de répondre aux exigences croissantes des consommateurs en produits alimentaires moins traités et exempts de conservateurs chimiques. Leurs apports bénéfiques consistent à l'amélioration de la qualité des produits fermentés en y développant certaines caractéristiques organoleptiques, sans altérer le goût ni l'odeur, et en augmentant leur durée de conservation. Cette préservation est conférée par la production de plusieurs métabolites ayant une activité antimicrobienne tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutéline, le diacétyle et les bactériocines **(Dortu et Thonart, 2009; Moraes et al., 2010)**.

L'objectif de cette étude est de mettre le point sur le pouvoir inhibiteur des bactéries lactiques et élucider les différents mécanismes de résistance au stress.

1. Chapitre 1 : Généralités sur les bactéries lactiques :

1.1. Présentation des bactéries lactiques :

Décrites pour la première fois par Orla-Jensen au début du XXe siècle, les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique. Elles rassemblent en effet un certain nombre de genres qui se caractérisent par la production, liée à un métabolisme exclusivement fermentaire, de quantités importantes d'acide lactique à partir des sucres. La fermentation est dite : homolactique si l'acide lactique est pratiquement le seul produit formé et hétérolactique si d'autres composés sont aussi présents (acide acétique, éthanol, CO₂ ...etc) (Leveau et Bouix, 1993 ; Pilet et al., 2005). Elles sont à Gram positif, généralement immobiles, asporulées, catalase négatives, oxydase négatives généralement nitrate réductase négative, ce sont des bactéries anaérobies facultatives. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (Dellaglio et al., 1994 ; Hogg, 2005).

1.2. Habitat et origine des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande, des végétaux. Elles se développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain. Quelques espèces colonisent le tube digestif de l'homme et des animaux (Leveau et Bouix, 1993 ; Hassan et Frank, 2001).

1.3. Taxonomie des bactéries lactiques :

Depuis la description du *Bacterium lactis*, la taxonomie des bactéries lactiques est en évolution permanente. Le nombre de nouvelles espèces a augmenté énormément au cours de ces dix dernières années. La classification phénotypique des bactéries lactiques est fondée sur la morphologie, la croissance à différentes températures, le mode de fermentation des sucres, la capacité de croissance à différentes concentrations de sel, la tolérance aux pH acides et alcalins, la configuration de l'acide lactique, l'hydrolyse de l'arginine et la formation d'acétoïne. Par ailleurs, une classification selon la composition de la paroi cellulaire (De Ambrosini et al., 1996) incluant la nature des acides gras qui la composent, a été proposée (Gilarová et al., 1994; König et Fröhlich, 2009).

Une autre classification, basée sur la nature des produits du métabolisme bactérien obtenus à partir des glucides a subdivisé les bactéries lactiques en trois groupes (**McLeod et al., 2008**).

-Groupe 1 : renferme majoritairement les lactobacilles homofermentaires.

-Groupe 2 : contient les bactéries hétérofermentaires et regroupe les espèces des genres *Leuconostoc*, *Oenococcus*, et *Weissella*, ainsi que quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus*.

-Groupe 3 : regroupe quant à lui quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus* et la majorité des espèces appartenant aux genres *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*. Ce dernier qui occupe une position intermédiaire entre les groupes 1 et 2, renferme ainsi des espèces capables d'être homo- ou hétérofermentaires selon les conditions environnementales (**McLeod et al., 2008**). Selon la seconde édition de Bergey's manual of systematic bacteriology (**Vos et al., 2009**).

Les bactéries lactiques sont classées dans le phylum des *Firmicutes*, la Classe des *Bacilli* et l'Ordre des *Lactobacillales*, renfermant trente-cinq genres répartis en six familles :

Aerococcaceae, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* et *Streptococcaceae*. Seuls douze genres sont utilisés en technologie alimentaire. L'appellation bactérie lactique est aussi souvent étendue aux genres *Bifidobacterium*, *Macrococcus*, *Brevibacterium* et *Propionibacterium* qui leur sont apparentés et qui sont également utilisés pour la fabrication de divers produits fermentés (**Klaenhammer et al., 2005 ; Pfeiler & Klaenhammer, 2007**). Ils bénéficient également du statut GRAS (**Adams et Marteau, 1995; Klaenhammer et al., 2005**). Quelques espèces du genre *Streptococcus*, *Enterococcus* et certains *Lactobacillus* sont néanmoins considérées comme des pathogènes opportunistes pouvant provoquer des maladies (**Aguirre et Collins, 1993 ; König et Fröhlich, 2009**).

La figure 1 représente les principaux genres des bactéries lactiques et le tableau 1 montre les différents genres à intérêt en microbiologie.

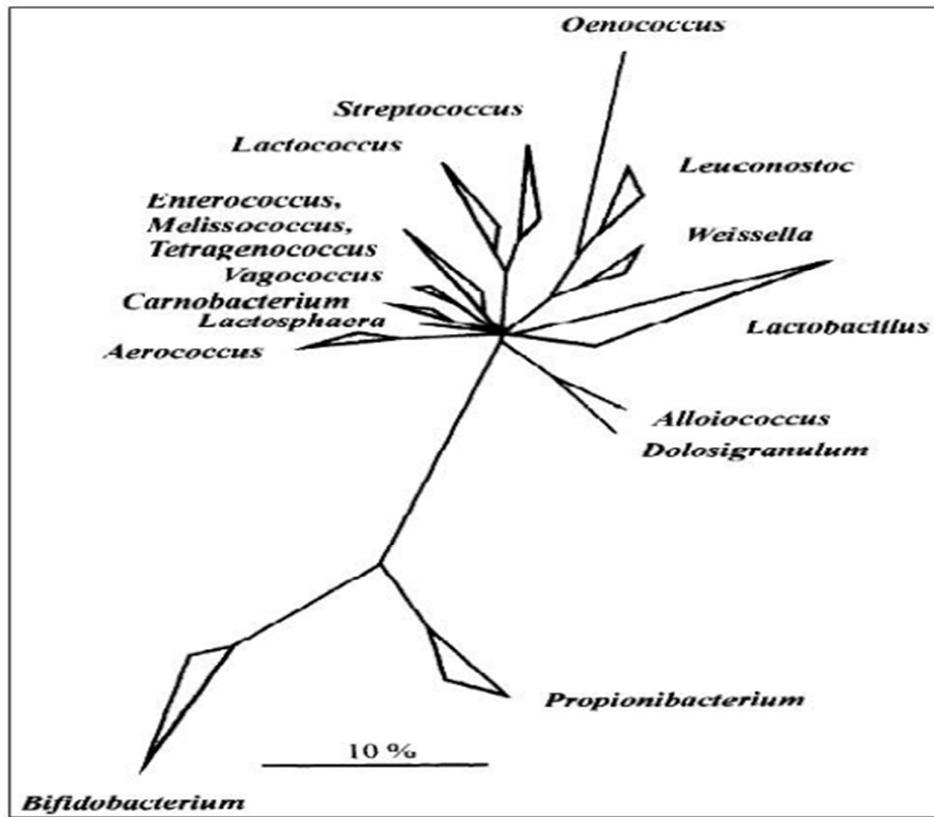


Figure 1 : Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16S (Stiles et Holzapfel, 1997).

Tableau1 : Les différents genres des bactéries lactiques d'intérêt en microbiologie des aliments et leurs principales caractéristiques (Fidirighi, 2005).

Genres	Morphologies	Fermentations	Caractéristiques principales	Habitats principaux
<i>Lactobacillus</i>	Bacilles	Homofermentaires ou Hétérofermentaires	Thermophiles ou mésophiles	Homme, produits Laitiers, produits carnés, végétaux
<i>Carnobacterium</i>	Bacilles	Hétérofermentaires	Psychrotrophes peu acidotolérants	Produits carnés, poissons, produits laitiers
<i>Lactococcus</i>	Coques	Homofermentaires	Mésophiles croissance à 45°C et non à 10°C, thermorésistants	Produits laitiers, végétaux
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Coques	Homofermentaires	Thermophiles	Produits laitiers
<i>Enterococcus</i>	Coques	Homofermentaires	Mésophiles, halophiles	Intestin de l'homme et des animaux, produit laitiers
<i>Bifidobacterium</i>	Coques mobiles	Homofermentaires	Mésophiles	Intestin de l'homme et des animaux
<i>Pediococcus</i>	Forme irréguliers	Acides acétique lactique	Mésophiles	Bière, produits végétaux, saucissons
<i>Tetragenococcus</i>	Coques en tétrades	Homofermentaires	Mésophiles	Saumures
<i>Leuconostoc</i>	Coques	Hétérofermentaires	Mésophiles	Produits végétaux, Produits laitiers
<i>Oenococcus</i>	Coques	Hétérofermentaires	Mésophiles	Vin

1.4. Caractéristiques des principaux genres de bactéries lactiques :

Parmi les différents genres des bactéries lactiques, seulement douze sont utilisés dans le domaine de la biotechnologie, il s'agit de :

1.4.1. *Enterococcus* :

Le genre *Enterococcus* constitue un genre majeur des bactéries lactiques. Les espèces de ce genre ont des attributs communs : cellules ovoïdes isolées, en paires ou en courtes chaînes, elles se caractérisent par leur tolérance à 6,5% de NaCl, au pH 9,6 et par la croissance à 10°C et 45°C avec une température optimale de croissance de 35°C à 37°C (Zhang et Cai, 2014). Les entérocoques peuvent être mobiles, homofermentaires, généralement différenciés par la fermentation de l'arabinose et le sorbitol (Tamime, 2002 ; Ho et al., 2007).



Figure 2 : *Enterococcus faecalis* observé au microscope électronique (Wallace et al, 2003)

1.4.2. *Lactobacillus* :

Lactobacillus est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*, il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries ou qui sont rencontrées comme contaminants. Il s'agit de bacilles longs

et fins (parfois incurvés) souvent groupés en chaînes, immobiles, asporulés, catalase négative, se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40°C. Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, en vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux (Khalid et Marth, 1990 ; Leclerc et al., 1994).

Le genre *Lactobacillus* a été subdivisé par Orla-Jensen en trois groupes et cette classification est encore utilisée en milieu industriel (Tamime, 2002 ; Guiraud et Rosec, 2004)

Groupe I « *Thermobacterium* » : comprend les lactobacilles homofermentaires thermophiles qui se développent à 45°C mais pas à 15°C. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation (lait, yaourt, fromage) sont *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus*.

Groupe II « *Streptobacterium* » : regroupe les lactobacilles homofermentaires mésophiles et peuvent être occasionnellement hétérofermentaires en fonction du substrat. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation sont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. Sake* et *Lb. plantarum*.

Groupe III « *Betabacterium* » : ce sont des lactobacilles hétérofermentaires. Il comporte les espèces *Lb. fermentum*, *Lb. brevis* et *Lb. anfrancisco*.

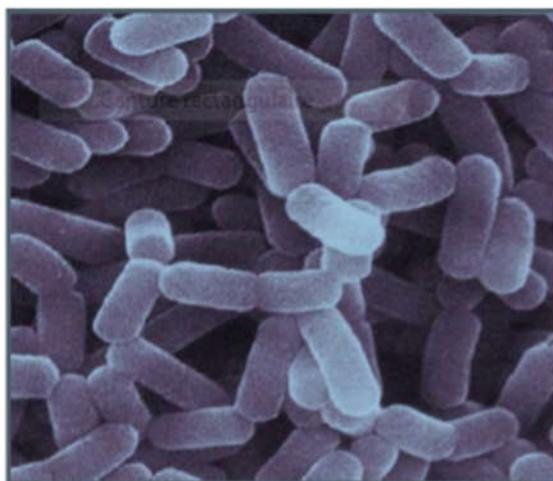


Figure 3 : *Lactobacillus casei* observé au microscope électronique (Corrieu et Luquet, 2008).

1.4.3. *Lactococcus* :

Les lactocoques se présentent sous forme de coques en paires ou en chaînes de longueur variable. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique L (+), seul *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* biovar. *diacetylactis* produit le diacétyle. Leur température optimale de croissance est proche de 30°C, capable à se développer à 10°C mais pas à 45°C. Quelques espèces produisent des exopolysaccharides et des bactériocines. Elles sont capables à se développer à 3% de bleu de méthylène et d'hydrolyser l'arginine (Tamime, 2002). Elles se développent généralement à 4% de NaCl et à un pH proche de la neutralité, leur croissance s'arrêtant lorsque le pH du milieu atteint 4,5. Ce genre est un habitant typique des plantes, des animaux et de leurs produits (Zhang et Cai, 2014).

Actuellement, le genre *Lactococcus* comprend cinq espèces, *Lactococcus lactis* est l'espèce la plus connue avec ses trois sous-espèces : *Lc. lactis* ssp. *lactis*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris* et *Lc. lactis* ssp. *hordniae* (Pot et al., 1996 ; Pot, 2008). Selon Guiraud (1998), le genre *Lactococcus* est représenté par les espèces suivantes : *Lc. lactis* ssp. *cremoris*, *Lc. lactis* ssp. *lactis* et *Lc. diacetylactis*. La sous espèce *Streptococcus Lactis* ssp. *diacetylactis* est remplacée par la sous espèce *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. Le lait est un habitat privilégié des lactocoques (Dellaglio et al., 1994 ; Corroler et al., 1999). *Lactococcus lactis* est l'espèce la plus étudiée et la plus fréquemment détectée dans les laits crus (Corroler et al., 1998 ; Dalmasso et al., 2008).



Figure 4 : *Lactococcus lactis* subsp *lactis* observé au microscope électronique (Pot, 2008).

1.4.4. *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*

Ils rassemblent les coques lenticulaires en paires ou en chaînettes mésophiles, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production d'acide lactique (isomère D), de CO₂ et d'éthanol. Les caractéristiques telles que l'hydrolyse de l'esculine, la formation de dextrane, les conditions de croissance, la capacité à croître à différents pH et à différentes température, l'assimilation de citrate et/ou malate permettent la différenciation entre les genres *Leuconostoc* et *Weissella* (Pilet et al., 1998 ; Ho et al., 2007).

Actuellement, le genre *Leuconostoc* comprend quatorze espèces, ils sont également anaérobies facultatifs et exigeants au point de vue nutritionnel et leur croissance est toujours lente. Le développement des *leuconostoc* entraîne souvent l'apparition d'une viscosité dans le milieu grâce à la production des exopolysaccharides. Les *leuconostoc* principalement *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris* et *Ln. Lactis* sont utilisés en association avec les lactocoques dans l'industrie laitière pour produire en plus de l'acide lactique et le CO₂, des substances aromatiques telles que le diacétyle et l'acétoïne à partir des citrates du lait (Hassan et Frank, 2001 ; Guiraud, 2003 ; Ogier et al., 2008). Récemment, l'espèce *Leuconostoc oenos* isolée de vins a été classée dans un nouveau genre, *Oenococcus oeni* et certaines espèces de lactobacilles hétérofermentaires ont été groupées avec *Leuconostoc paramesenteroides* dans le nouveau genre *Weissella* (Stiles et Holzappel, 1997).

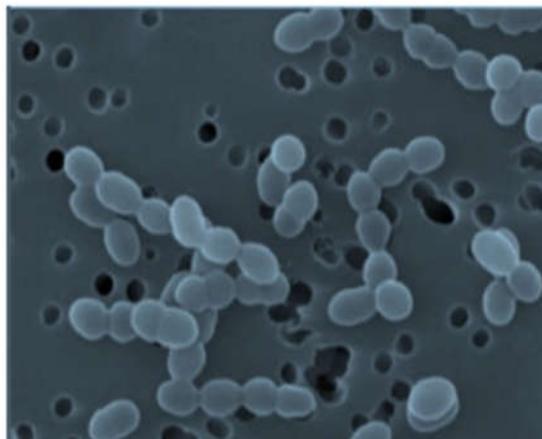


Figure 5 : *Leuconostoc mesenteroides* observé au microscope électronique.
(Wallace et al., 2003)

1.4.5. *Pediococcus* et *Tetragenococcus* :

Les *Pediococcus* sont des coques homofermentaires dont la particularité est le regroupement en tétrade. Ils sont mésophiles, le plus souvent incapables d'utiliser le lactose, et leur développement nécessite la présence de divers facteurs de croissance. Certaines espèces se distinguent par leur capacité à se développer à des teneurs en sels très élevées, comme *Pediococcus halophilus*, renommé *Tetragenococcus halophilus* et *Tetragenococcus muriaticus* qui tolère jusqu'à 18% de NaCl (Pilet et al., 2005). Les espèces de *Tetragenococcus* ont un rôle crucial dans la fabrication des produits alimentaires à concentration élevée en sel comme les sauces de soja, alors que les pediocoques sont parfois utilisés comme levains lactiques pour les charcuteries (Guiraud et Rosec, 2004 ; Tosukhowong et al., 2005).

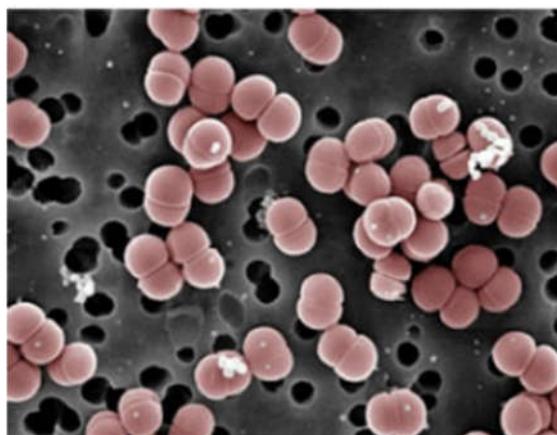


Figure 6 : *Pediococcus* observé au microscope électronique (Wallace et al., 2003)

1.4.6. *Streptococcus* :

Ce genre est généralement divisé en trois groupes : pyogène (la plupart des espèces pathogènes et hémolytiques), oral (tel que *St. salivarius*, *St. bovis*) et les autres streptocoques (Scheilfer, 1987). Les cellules de ce genre sont immobiles, sphériques ou ovoïdes qui ont un diamètre inférieur à 2 μ m avec une disposition en paires ou en chaînes longues. La fermentation des carbohydrates produit principalement de l'acide lactique mais il n'y a pas de production de gaz. Le peptidoglycane est du groupe A et leur température optimale de croissance est 37°C. Elles sont incapables à se développer à 15°C et à pH 9,6. Beaucoup d'espèces sont commensales ou parasites de l'homme et des animaux et certaines sont hautement pathogènes. La seule espèce de streptocoques qui soit utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus*

thermophilus qui a été incluse dans le groupe des « autres streptocoques », mais ensuite transféré au groupe des streptocoques oraux à cause de leur degré d'homologie avec l'ADN de *Streptococcus salivarius* (Stiles et Holzapfel, 1997). *Streptococcus thermophilus* se différencie par son habitat (lait et produits laitiers) et son caractère non pathogène. La résistance à la température, la capacité de croître à 52°C et le nombre limité des hydrates de carbones permettent de distinguer les *St. Thermophilus* de la plupart des autres streptocoques (Hadie, 1986 ; Pilet et al., 2005).



Figure 7 : *Streptococcus thermophilus*, observé au microscope électronique (Corrieu et Luquet, 2008).

1.4.7. Bifidobacterium :

Le genre *Bifidobacterium* est considéré comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de ses propriétés physiologiques et biochimiques et à sa présence dans le même habitat écologique, tel que le tube gastro-intestinal. Ces microorganismes sont phylogénétiquement sans rapport avec ces dernières. Ils sont davantage liés au phylum *Actinobacteria* (anciennement Actinomycètes) des bactéries Gram positif dont l'ADN est à haut pourcentage de G +C. Les bifidobactéries se caractérisent par leur forme très irrégulière souvent en forme V mais pouvant être coccoïdes, la présence d'une enzyme, la fructose-6-phosphate phosphocétolase, celle-ci leur permet de fermenter les hexoses en produisant de l'acide acétique et de l'acide lactique. Leur température de croissance varie de 36°C à 43°C (Axelsson et al., 2004 ; Pilet et al., 2005 ; Ho et al., 2007).

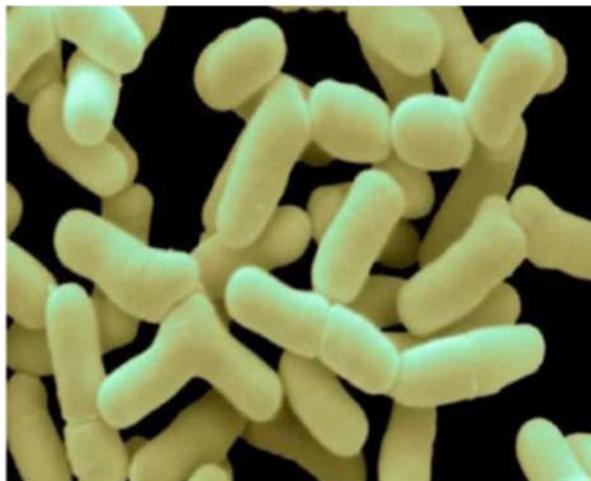


Figure 8 : *Bifidobacterium* sp observé au microscope électronique
(Wallace et al., 2003).

1.5. Métabolisme des bactéries lactiques

La fermentation est un processus produisant de l'énergie par oxydation de composés organiques, principalement des glucides, où un donneur d'électron, NADH cède ses électrons à un accepteur endogène le pyruvate, Dans la respiration les électrons sont donnés à un accepteur exogène, l'oxygène pour la respiration aérobie et le nitrate ou le sulfate pour la respiration anaérobie. (Prescott et al., 2003).

1.5.1.Principales vois fermentaires des bactéries lactiques :

1.5.1.1. Voie homofermentaire (EMP) ou la glycolyse :

Les bactéries lactiques homofermentaires comprennent les espèces des lactocoques, pédiocoques, ainsi que certains lactobacilles (Tompson et Gentry-Weeks, 1994).

Les bactéries appartenant aux genres *Streptococcus* et certaines espèces de *Lactobacillus* comme *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus caucasicus*, *Lactobacillus lactis* et *Lactobacillus plantarum* et par *Thermobacterium yoghurti*. (Makhloufi, 2012).

La glycolyse conduit dans des conditions optimales de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée. (Tompson et Gentry-Weeks, 1994). Des sucres autres que le glucose peuvent également être

fermentés via cette voie : monosaccharides, dissaccharides, hexitols. Ces microorganismes présentent un métabolisme de type homolactique lorsque le lactate représente plus de 90% des produits de fermentation. Dans certaines conditions de croissance (certains sucres, limitation carbone ...etc.), le métabolisme de ces bactéries se diversifie vers un métabolisme mixte avec production en plus du lactate, de formiate, de CO₂, d'acétate et d'éthanol (**Loubiere et Bousquet, 2009**). Toutes les bactéries lactiques à l'exception des genres : *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* et certaines espèces du genre *Lactobacillus*, entravent la voie de la glycolyse pour dégrader les hexoses (ex : glucose). La fructose-1,6-biphosphate aldolase (FBA), est une enzyme clé présente chez toutes les espèces homofermentaires et indispensable au fonctionnement de la voie EMP. Après son transfert vers la cellule, le glucose subit une phosphorylation pour se transformer en fructose qui est à son tour phosphorylé en fructose 1-6 biphosphate (FBP) puis clivé en dihydroxyacétone phosphate (DHAP) et glycéraldéhyde phosphate (GAP). Ces deux derniers sont convertis en pyruvate. Le pyruvate est dans une dernière étape réduite en acide lactique qui est le produit unique : c'est la fermentation homolactique (**Mozzi et Viguolo, 2010**).

1.5.1.2. Voie hétérofermentaire :

Les bactéries lactiques qui fermentent le glucose en produisant, en plus de l'acide lactique (moins de 1.8 moles par mole de glucose), de l'acétate, de l'éthanol et du CO₂ sont dites hétérofermentaires (**Tompson et Gentry-Weeks, 1994**). La voie hétérofermentaire, communément appelée voie des pentoses phosphate (transcétolases) se produit chez les espèces appartenant à *Lactobacillus*, telles que *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermenti* et chez *Leuconostoc*, telles que *Leuconostoc mesenteroides* et *Leuconostoc pentosaceus*. Ces bactéries dégradent les hexoses avec formation quasi stœchiométrique d'une molécule d'acide lactique, d'une molécule de CO₂ et d'une molécule d'éthanol. Les sucres à cinq atomes de carbone ou pentoses, peuvent parfois être fermentés et donnent alors une molécule d'éthanol et une molécule d'acide lactique. Outre ces produits, qui représentent plus de 80% des métabolites obtenus, on obtient également de l'acide acétique et du glycérol (**Makhloufi, 2012**).

1.1.1. Voie bifide :

Il existe une voie de fermentation particulière au genre *Bifidobacterium* appelée voie bifide. Le bilan net de cette voie bifide est 1,0 mole de lactate, 1,5 mole d'acétate et 2,5 moles

d'ATP par mole d'hexose, ce qui est légèrement supérieur au rendement de la glycolyse en terme énergétique (Tompson et Gentry-Weeks, 1994).

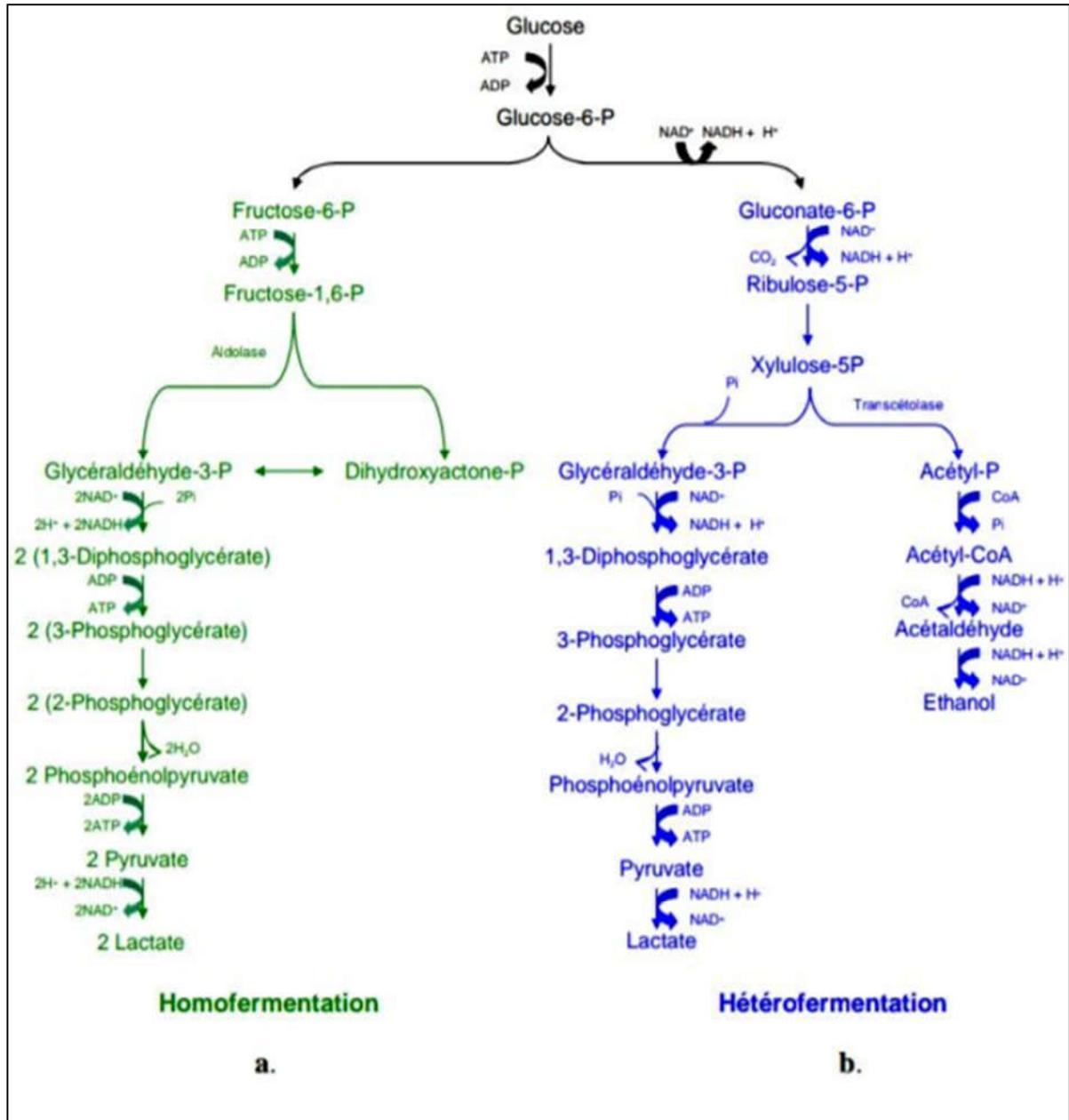


Figure 9 : Représentation schématisée des principales voies de fermentation des bactéries lactiques (Prescott et al., 2003).

ATP : Adénosine triphosphate. ADP : Adénosine diphosphate. NAD⁺/ NADH, H⁺ : Couple oxydant/réducteur du nicotinamide/adénine dinucléotide. Pi: Phosphate inorganique

1.6. Intérêt des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques jouent un rôle important que ce soit dans l'industrie alimentaire ou dans le domaine thérapeutique.

1.6.1. Rôle des bactéries lactiques dans le domaine thérapeutique :

Dans le domaine de la santé, certaines bactéries lactiques spécifiques sont utilisées comme probiotiques c'est-à-dire des micro-organismes vivants dont l'application à l'homme ou à l'animal exercent un effet bénéfique sur ce dernier par amélioration des propriétés de la flore intestinale. Les espèces couramment utilisées sont *Lb. Acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. johnsonii*, *Lb. reuteri*, *Lb. delbruecki*, subsp *bulgaricus* (Salminen et al., 2004). Les souches lactiques sont également utilisées dans le traitement de certaines affections telles que les diarrhées, les allergies alimentaires. D'autres effets, comme la prévention des gastro-entérites nosocomiales chez le nourrisson, des propriétés anticancérigènes, antihypercholestérolémiques, lutte contre *Clostridium* et *Helicobacter pylori*, prévention des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

1.6.2. Rôle des bactéries lactiques dans l'industrie alimentaire :

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis longtemps dans la fabrication de divers produits fermentés (Leroy et Devuyst, 2004). Elles interviennent dans la transformation de divers produits agroalimentaires, comme le lait (crème maturée, yaourt, fromage...), dans la vinification, la fabrication des salaisons, fermentation des végétaux (Hamoum, ensilage...) et en boulangerie traditionnelle (Desmazeaud, 1998).

Les bactéries lactiques ont plusieurs rôles dans la production des produits fermentés. Le premier rôle, intervient dans le changement de la saveur et la texture de l'aliment, grâce à l'acide lactique sécrété par les bactéries lactiques tout au cours de leur croissance. Les bactéries lactiques produisent ainsi des peptides et des molécules comme l'acétoïne, l'acétaldéhyde, le diacétyle ou l'éthanol qui sont importants pour la saveur des aliments (Pilet et al., 2005).

En production laitière, la fermentation lactique joue un rôle primordial, c'est-à-dire, les ferments lactiques naturels ou commerciaux interviennent dans l'élaboration de tous les produits laitiers fermentés (Pilet et al., 2005). Ces ferments assurent plusieurs fonctions, telles

que la protéolyse qui donne aux fromages leurs caractères rhéologique (viscosité, plasticité et l'élasticité) et la production des agents épaississants pour améliorer la texture du fromage.

1.6.3. Rôle des bactéries lactique dans la bioconservation et la biopréservation :

La bioconservation, comme toute autre méthode de conservation doit permettre non seulement de maîtriser la croissance de flores pathogènes ou d'altération, mais également de préserver les qualités organoleptiques et nutritionnelles du produit tout au long de sa durée de vie (**Garry, 2010**).

Les bactéries lactiques sont impliquées dans la fermentation et la bioconservation de différents aliments ainsi les souches de *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* sont utilisées pour la production du yaourt, des fromages et des laits fermentés (**Yateem et al., 2008**).

La biopréservation ou bioprotection est une méthode de conservation des aliments faisant appel à des microorganismes ou des à « composés naturels » en opposition à l'utilisation de conservateurs dits « chimiques ». Cette thématique a fait l'objet de nombreux travaux ces deux dernières décennies. Il existe différentes voies permettant la biopréservation. Ainsi, il est possible d'utiliser des micro-organismes tels que les bactéries lactiques. Pour pouvoir utiliser ces bactéries il faut démontrer leur innocuité pour le consommateur et la qualité des produits alimentaires.

Les modes d'action de cette flore sont variés :

- Acidification de l'aliment par production d'acides organiques comme l'acide lactique ou l'acide acétique,
- Production de bactériocines comme la pédiocine, la nisine, et divers autres métabolites,
- Compétition vis à vis des nutriments,
- Production de dioxyde de carbone (CO₂),
- Production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). (**Garry PF. 20010**).

2. Chapitre 2 : Pouvoir inhibiteur des bactéries lactiques

2.1. Substances inhibitrices produites par les bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques peuvent empêcher l'adhésion de plusieurs bactéries pathogènes par la sécrétion d'inhibiteurs d'adhérence. Cette capacité se retrouve chez plusieurs bactéries lactiques telles que les *Lactobacillus*, *Streptococcus thermophilus* et *Bifidobactéries* (**Matto, et al. 2006**).

Les bactéries lactiques constituent un moyen biologique efficace pour la préservation des qualités hygiéniques des aliments, du fait de leur aptitude inhibitrice vis-à-vis des microorganismes nuisibles (**Caridi et al.,2003**). En effet, les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes, comme des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène, du dioxyde de carbone, de la reutérine, du diacétyle et des bactériocines (**Dortu et Thonart, 2009**).

2.1.1.Acides organiques :

Les acides organiques sont produits par les bactéries lactiques au cours du processus de fermentation alimentaires. Leurs effets antimicrobiens sont bien connus à l'heure actuelle (**Tou et al., 2006**). Ces acides, sous leur forme dissociée ou non dissociée, agissent au niveau de la membrane et en inhibant les systèmes membranaires de transport actif (**Annan et Agyeman, 1997**).

L'activité antimicrobienne d'un acide organique dépend de sa nature (Acide fort, acide faible). L'acide acétique, par exemple, est plus inhibiteur que l'acide lactique ; il inhibe les levures, les moisissures et les bactéries (**Blom et Mortvedt, 1991**).

2.1.2.Acides gras :

L'activité antimicrobienne des acides gras a été identifiée pendant plusieurs années. Les acides gras insaturés présentent une activité contre les bactéries à Gram+, et l'activité antifongique des acides gras dépend de la composition, de la concentration, et du pH du milieu (**Gould, 1991**).

2.1.3. Peroxyde d'hydrogène :

Les bactéries lactiques sont dépourvues de catalases catalysant la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène (Condon, 1987). Le peroxyde d'oxygène peut s'accumuler et être inhibiteur de différents microorganismes par l'oxydation des lipides membranaires et la destruction des structures des protéines cellulaires (Zalan et al., 2005).

2.1.4. Dioxyde de carbone :

Le dioxyde de carbone est produit principalement par voie hétérofermentaire. Le mécanisme précis de ses propriétés antimicrobiennes est encore inconnu. Cependant, le CO_2 peut jouer un rôle dans la création d'un environnement anaérobie qui inhibe la décarboxylation enzymatique, et l'accumulation de CO_2 dans la bicouche lipidique de la membrane peut provoquer un dysfonctionnement de la perméabilité (Ammor et al., 2006). Le CO_2 peut inhiber efficacement la croissance de nombreux micro-organismes responsables de la détérioration des aliments, en particulier les bactéries Gram négatives psychrotrophes. Le degré d'inhibition par le CO_2 varie considérablement entre les micro-organismes. Le CO_2 à 10% pourrait réduire les charges bactériennes de 50%, et à 20-50%, il a une forte activité antifongique (Yang, 2000).

2.1.5. Diacétyle :

Le diacétyle est un produit du métabolisme du citrate qui est responsable de l'arôme des produits laitiers. Le diacétyle a des propriétés antimicrobiennes qui sont dirigées contre les levures, les bactéries Gram-négatif et les bactéries Gram-positif non lactiques, ces dernières y sont néanmoins moins sensibles (El Ziney et al., 1998).

2.1.6. Reutéline :

Lactobacillus reuteri, une espèce de bactéries lactiques dont la niche écologique est le tractus gastro-intestinal des humains et des animaux, convertit le glycérol en une substance antimicrobienne appelée reutéline (Axelsson et al., 1989). La reutéline est un agent antimicrobien puissant à faible poids moléculaire, neutre et soluble dans l'eau et résistant aux enzymes (Axelsson et al., 1989). La reutéline est active contre les bactéries à Gram positif et négatif, ainsi que les levures, les moisissures et les protozoaires (Cleusix et al., 2007). Les microorganismes d'altération comprenant les espèces de *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*,

Staphylococcus, *Listeria*, *Candida*, et *Trypanosoma* sont aussi sensibles à la reutérine (Yang, 2000).

2.1.7.Acétaldéhyde :

Les bactéries lactiques sont capables de produire de l'acétaldéhyde à partir du glucose (Devoyod et Poullain, 1988). Chez *Lb. Delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, l'action d'une thréonine aldolase, clive la thréonine en acétaldéhyde et en glycine. L'acétaldéhyde à une concentration de 10 à 100 ppm empêche la croissance de *Staphylococcus aureus*, de *Salmonella Typhimurium* et d'*E. Coli* dans les produits laitiers (Piard et Desmazeaud, 1991).

2.1.8.Bactériocines :

Les bactériocines sont des familles de peptides ou protéines de 20 à 60 acides aminés synthétisées naturellement par un très nombre de souches de bactéries lactiques comme bactéries à Gram positif (Federighi et Jouve, 1998). La définition qui était la plus acceptée donnée aux bactériocines est celle de Klaenhammer qui les définit en tant que protéines ou complexes de protéines ayant une activité bactéricide contre les espèces étroitement liées à la souche productrice (Xie et Lipke, 2011).

Les bactériocines représentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action (Klaenhammer, 1988). Cependant, des études récentes ont démontré qu'il existe certaines qui sont actives également contre des bactéries à Gram négatif (Luquet et Corrieu, 2005). Les souches les produisant peuvent donc également être utilisées dans des produits non fermentés en tant que culture protectrice. Une culture protectrice est une culture antagoniste ajoutée à un produit alimentaire pour inhiber les bactéries pathogènes et/ou altérantes et ainsi prolonger sa durée de vie en changeant ses propriétés organoleptiques le moins possible (Matto et al., 2006)

Les bactériocines sont réparties en trois classes (Klaenhammer, 1988) :

- Les bactériocines de classe I ou lantibiotiques
- Les bactériocines de classe II : La classe II peut être subdivisée en quatre sous classes IIa à IId.
- Les bactériocines de classe III

Tableau : Classification des bactériocines des bactéries lactiques
(Corrieu et Luquet, 2005).

Classe	Sous-catégorie
Classe I : l'antibiotique	Type A : molécules linéaires Type B : molécules globulaires
Classe II : bactériocines non modifiées thermostables	Classe : anti-listeria Classe : bactériocines à deux composants Classe : autres bactériocines
Classe III : bactériocines de grande taille, sensibles à la chaleur	

Classe I « Les lantibiotiques » : peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post-traditionnellement, c'est-à-dire la lanthionine, la β -méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine. Ils peuvent être divisés en deux types :

- La classe Ia qui comprend des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés
- La classe Ib qui comprend les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés Dans cette classe on retrouve la nisine A et Z produites par *Lactococcus lactis*. (De Vuyst et Vandamme, 1994).

2.2. Limites d'utilisation des bactériocines :

L'application des bactériocines constitue certes une méthode « naturelle » de conservation des aliments, mais sa mise en œuvre n'est pas aisée. En effet, les nombreuses propriétés des bactériocines favorisant leur utilisation dans le domaine agroalimentaire et/ ou médical n'empêchent pas l'existence de contraintes relatives à leur utilisation. Le coût élevé de préparations de bactériocines pures prêtes à l'emploi entraîne de loin la limite la plus importante. D'où l'utilisation plus commune des souches productrices plutôt que des bactériocines isolées.

La composition de l'aliment représente le premier facteur pouvant réduire ou totalement dissiper l'activité inhibitrice de la bactériocine en raison de son adsorption sur des composants du produit, la limitation de sa solubilité et de sa diffusion, sa dégradation par des protéases, l'interaction avec des additifs alimentaires ou des ingrédients et/ ou un pH inapproprié. Les traitements appliqués aux produits constituent un deuxième facteur pouvant limiter l'effet antimicrobien de la bactériocine dans un produit alimentaire. En effet, des traitements thermiques trop élevés peuvent dégrader les bactériocines bien que la majorité d'entre elles soient résistantes à la chaleur (**Dortu et Thonart, 2009 ; Gálvez et al., 2007**).

2.3. Conditionnement des bactériocines :

Il est très difficile de conditionner les bactériocines sous la forme purifiée. Les bactériocines semi-purifiées peuvent être conditionnées sous forme sèche par atomisation ou lyophilisation (**Parente et Riccardi, 1999**). La nisine, la seule bactériocine légalement approuvée comme additif est commercialisée sous forme semi-purifiée (**Dortu et Thonart, 2009**).

Le dernier facteur limitant l'activité des bactériocines est la présence de bactéries résistantes et de microorganismes qui dégradent les bactériocines par l'effet de protéases qu'elles produisent à l'état physiologique. De plus, dans les produits solides, les bactéries forment des biofilms dont la résistance aux bactériocines peut être plus élevée (**Schöbitz et al., 2003**). D'autre part, il sera également important de considérer l'impact de la bactériocine sur la flore résidente. La sensibilité de la flore à la bactériocine entraîne un déséquilibre qui peut conduire à la croissance et la prolifération de microorganismes pathogènes résistants aux bactériocines (**Dortu et Thonart, 2009**).

2.4. Applications des bactériocines :

2.4.1. Bactériocines en agroalimentaire :

La bioconservation des aliments fait l'objet depuis 40 ans de nombreuses études. Elle consiste en une augmentation de la durée de vie et une amélioration de la sécurité sanitaire des produits alimentaires, en utilisant des microorganismes et/ ou leurs métabolites (**Ross et al., 2002, Stiles, 1996**).

2.4.1.1. Propriétés des bactériocines pour une application alimentaire :

Les bactériocines sont habituellement reconnues comme sûres, sont sensibles aux protéases digestives et ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes (**Wijaya et al., 2006**). Elles ont une grande tolérance aux variations de pH et aux traitements thermiques. Leur spectre antimicrobien peut être large ou étroit, elles peuvent donc cibler sélectivement des bactéries pathogènes ou altérantes sans inhiber les bactéries indispensables et ont un mode d'action bactéricide. Les bactériocines doivent cependant être considérées comme un moyen de préservation complémentaire à ceux déjà existant (**Deegan et al., 2006**).

2.4.1.2. Applications des bactériocines dans le secteur alimentaire :

Les bactériocines sont employées dans plusieurs domaines. Leur utilisation dans le domaine alimentaire est devenue très intéressante grâce à leur potentiel d'assurer une sécurité microbienne et une bonne qualité du produit alimentaire (**Delves-Broughton, 1990 ; Benech, et al., 2002**).

L'utilisation des bactériocines comme additifs naturels dans les aliments a suscité l'intérêt du consommateur qui cherche à minimiser l'utilisation des additifs chimiques artificiels dans les produits alimentaires. Plusieurs études ont montré l'efficacité de la nisine en tant qu'agent de conservation dans les aliments comme la truite fumée (**Nykanen et al., 1999**), les produits à base d'œufs liquides pasteurisés (**Delves-Broughton et al., 1996**), les fromages et d'autres produits laitiers (**Delves-Broughton, 1990**).

En effet, la nisine est la plus étudiée des bactériocines et la seule utilisée commercialement dans les produits alimentaires. Un autre mode d'application des bactériocines consiste en leur immobilisation sur les cellules productrices, dans des gels ou des films telle que la gélatine, la cellulose, les protéines de soja, des films de polysaccharides etc...., La bactériocine sera alors libérée dans les produits au cours de la conservation (**Luchansky et al., 2004 ; Deegan et al., 2006 ; Ghalfi, 2006 ; Galvez et al., 2007**).

2.4.2.Applications médicales des bactériocines :

L'émergence de la résistance aux antibiotiques conventionnels ces dernières années a orienté la recherche vers l'étude de nouveaux agents antimicrobiens. Le mode d'action des bactériocines qui diffèrent de ceux des antibiotiques conventionnels et l'innocuité des bactériocines permettraient leur utilisation comme alternative aux antibiotiques dans la prévention et/ou le traitement des infections dues à des bactéries devenues résistantes aux traitements conventionnels (**Dicks et al., 2011**).

Contrairement aux applications alimentaires des bactériocines, aucune de bactériocine n'est à ce jour commercialisée comme médicament. Cependant, quelques-unes d'entre elles sont en cours d'essais cliniques pour le traitement d'infections cutanées, respiratoires, systémiques et/ou urogénitales ainsi qu'en tant qu'agents contraceptifs parmi elles la rBPI21 en phase clinique III pour le traitement de la méningite (**Hancock, 20**

3. Chapitre 3 : Le stress chez les bactéries lactiques

3.1. Comment étudier un stress ?

La notion de stress intervient à partir de que les conditions optimales de croissance d'un microorganisme ne sont pas réunies. Par conséquent, quelle que soit sa nature, toute modification environnementale conduisant à des conditions de croissance non favorables va perturber la physiologie cellulaire et sera donc perçue comme un stress. La capacité d'adaptation des microorganismes aux différentes conditions de vie qu'ils rencontrent va être déterminante pour leur survie et leur développement (**Alexander et al., 2008**)

3.2. Définition du stress :

On peut définir le stress comme une condition hostile qui tend à empêcher un système de fonctionner de façon optimale. Toutefois, si on se limite à cette assertion, il reste à définir l'état optimal. Aussi le stress peut être considéré comme l'ensemble des conditions qui provoquent des changements de processus physiologique conduisant éventuellement à une inhibition de croissance voire en dommages cellulaires, ces changements imposent à la cellule de développer des mécanismes de résistance qui permettent la survie ou simplement une meilleure croissance (**Booth, 2002**).

Ainsi les stress peuvent être biotiques (concurrence) ou abiotiques (physico-chimique) et affectent principalement deux « compartiments » : l'enveloppe cellulaire et le cytoplasme. Les réponses chez les bactéries visent soit à rétablir l'homéostasie (réponse SOS, expression de chaperons, synthèse de transporteurs...), soit à se protéger des effets du stress (modification de l'enveloppe, sporulation, formation de biofilm, motilité...). Par ailleurs, la réponse peut être spécifique et/ou générale c'est-à-dire dépendante ou indépendante de la nature du stress (**Ghazouani, 2013**).

La résistance d'un micro-organisme face à un stress donné dépend de son état physiologique. Les cellules qui ont cessé de croître, qui se développent lentement ou qui sont entrées en phase stationnaire acquièrent un niveau général de protection au stress supérieure à celui des cellules en plein de croissance (**Martin et al., 1995**), La résistance au stress d'une population bactérienne dépend également de la composition du milieu de culture (**Annous et al., 1990 ; Guillot et al, 2000 ; Carvalho et al ,2003**).

3.3. Modalité d'application du stress :

Les études publiées abordant la notion de stress selon deux modalités d'application possible : application prolongée d'une contrainte modeste ou application brutale d'un stress létal (**Kempf et Bremer, 1998 ; Piuri et al., 2003**).

3.3.1. Stress prolongé :

Cette modalité d'application du stress consiste à inoculer les bactéries dans un milieu modérément hostile, c'est-à-dire permettant une croissance. Il s'agit ici de suivre l'adaptation progressive (ou acclimatation) de la bactérie face à un stress prolongé (**Kempf et Bremer, 1998**).

L'évaluation de l'impact du stress prolongé sur la croissance est classiquement réalisée par turbidimétrie en mesurant les effets des variations des paramètres de croissance. Il peut s'agir de l'augmentation du temps de latence (**Vasseur et al., 1999 ; Mellefont et al., 2003**), ou de la diminution du taux de croissance et de l'absorbance finale (**Kim et Dunn, 1997 ; Vasseur et al., 1999 ; Marceau et al., 2003**).

3.3.2. Stress de type choc :

Le stress peut également prendre la forme d'une contrainte intense et de courte durée (chocs, ou « acute stress ») (**Piuri et al., 2003**), La réponse de la bactérie sera évaluée en terme de survie après que la contrainte ait été supprimée, et ceci principalement par numération sur milieu gélosé plusieurs facteurs influencent le taux de survie d'une population bactérienne après un stress de type choc : l'état physiologique des cellules, le genre, l'espèce et parfois même la souche considérée (**Kim et al, 1999**). Il est à noter que selon Booth (2002), les individus d'une même population réagiraient de façon collégiale aux variations environnementales et seraient probablement capables de développer des mécanismes de signalisation inter-cellulaire. L'impact d'un stress sur la viabilité serait donc susceptible de différer selon que son évaluation soit réalisée sur milieu gélosé ou bien en milieu liquide.

Les cellules d'une même culture bactérienne ne sont pas toutes exactement dans le même état physiologique si la croissance n'est pas synchronisée. Chacune possède un contenu protéique donné et présente, par conséquent, un niveau de résistance au stress létal différent. Ainsi, les cellules d'une même population de *Lc. lactis* ayant survécu à un stress intense

(99,99% mortalité) sont toutes capables de croître ultérieurement en absence de stress, tandis que seule une proportion peut survivre à un stress intense ultérieur (**Kim et al ,2002**). Les cellules survivant au premier stress ne possédaient donc pas toutes le même équipement de réponse au stress.

3.4. Effet du stress sur les bactéries :

3.4.1.Effet sur la croissance, la survie et la morphologie :

Les effets du stress dépendent des modalités d'applications de ce dernier (accumulation ou choc). Ils entraînent surtout des défauts de croissance et/ou des viabilité chez les bactéries. Les bactéries lactiques sont soumises à des stress multiples pouvant provenir de la croissance bactérienne elle-même (par acidification du milieu par appauvrissement en nutriments) ou imposés dans l'environnement (par modification de la température ou du PH, choc osmotique, lyophilisation, etc) (**Jobin et al ,1998**). L'observation des cellules stressées par microscopie révèle différents types de modifications morphologiques (**Derzelle et al ,2000**). Ainsi, un phénomène d'allongement a été décrit chez *Lb.acidophilus* en présence d'un stress hypothermique (**Lorca et Font de valdz ,1999**).

En réponse aux chocs osmotiques les bactéries lactiques ont développé des systèmes de défense efficaces contre les stress osmotiques (**Romeo et al ,2001**). La réponse moléculaire des bactéries lactiques au stress osmotique a été entreprise chez *Lactobacillus plantarum et Lactococcus lactis* (**Glassker et al., 1998**). Le stress peut également provoquer un événement d'agrégation cellulaire, comme c'est le cas chez *Lb. alimentarius* en présence d'un stress hyperosmotique (**Lemay et al., 2000**). Les bactéries lactiques ne survivent pas à une acidification brutale de milieu. Par contre, cette survie peut être augmentée par une phase d'adaptation à des pH immédiates (**Rallu,1999**).

3.5. Stress osmotique :

3.5.1.Osmose et stress osmotique :

Le phénomène d'osmose correspond à la diffusion spontanée, sous la seule influence de l'agitation moléculaire, d'un composé chimique à travers une membrane semi-perméable. Il se produit lorsqu'une substance est présente à des concentrations différentes de part et d'autre de

la membrane. Cette différence engendre un excès de pression, appelé pression osmotique. La diffusion se fait alors de manière à ce que les deux concentrations tendent à s'égaliser. Le corps dissous dans l'eau franchit la membrane vers la solution la moins concentrée sous l'effet de la pression osmotique. Ce transfert spontané ne nécessite aucune dépense d'énergie et joue un rôle essentiel dans l'activité des cellules. Par osmose, les cellules vivantes peuvent, par exemple, capter des nutriments dont elles ont besoin et rejeter leurs déchets (**Baliarda, 2003**).

Le stress osmotique correspond à une diminution ou une augmentation de l'osmolarité de l'environnement de la bactérie (**Csonka, 1989**) qui, en modifiant la disponibilité de l'eau de la cellule, affecte sa survie et/ou sa croissance (**Potts, 1994**).

3.5.2. Effets de stress osmotique sur les bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques vivent dans des habitats où l'osmolarité est souvent élevée et varie énormément, alors que la pression osmotique intracellulaire doit rester relativement constante. Lorsqu'une bactérie subit un stress osmotique, dû à une forte augmentation de la concentration en sel dans l'environnement, sa croissance est arrêtée, et des mécanismes de détresse se mettent en place pour éviter la mort cellulaire (**Romeo, 2001**). Ainsi, la croissance de *Lactococcus lactis* dans un milieu à 2,5 % NaCl (concentration proche de celle rencontrée dans certains fromages) est réduite de 25 % à 50 % par rapport à une croissance à pression osmotique normale (**Kilstrup et al., 1997**).

3.6. Stress thermique :

La conservation par élévation ou abaissement de la température provoque des perturbations importantes de la croissance qui font suite à des lésions de la membrane et de la paroi ainsi que des altérations des macromolécules cytoplasmiques (protéines, ADN, ARN, ribosomes) (**Guchte et al., 2002**). La réponse face au stress thermique se traduit par la synthèse de protéines de type Hsp (pour Heat-shock protein) ou de type Csp (Cold-shock protein) réparant les dommages (dégradation/repliement des protéines dénaturées) et préparant la bactérie à survivre dans des conditions plus délétères (maintien du niveau de transcription et de traduction, modification de la proportion d'acide gras courts et/ou insaturés dans les lipides, activation des mécanismes de réponse générale au stress) (**Abee et Wouters, 1999 ; Phadtare et al., 2000 ; Van et al., 2002**).

3.6.1. Adaptation à une élévation de température :

Un choc thermique consiste à soumettre des cellules, de façon transitoire, à une température supérieure à leur température optimale de croissance. Cette élévation brusque de la température induit une augmentation rapide et transitoire de la synthèse des protéines de choc thermique, avec en parallèle une diminution temporaire de la synthèse des autres protéines cellulaires (**Haredeen et al., 1979**).

Cette réponse est universelle et représente un des systèmes génétiques les plus conservés entre tous les organismes. Les bactéries lactiques présentent une réponse au stress hyperthermique similaire à celles des autres bactéries à Gram positif : *Lactococcus lactis* (**Whitaker et Batt, 1991 ; Auffray et al., 1992 ; Kilstrup et al., 1997**), *Lb.bulgaricus* (**Gouesbet et al., 2002**).

3.6.2. Adaptation à un choc froid :

Suite à une baisse importante de température les bactéries adaptent deux réponses distinctes. La première est à l'échelle cytoplasmique : la baisse de température entraîne la formation de structures secondaires sur l'ARNm, et par la suite une baisse de l'efficacité de la transcription et de la traduction. Les bactéries augmentent alors la production des protéines de choc au froid (cold choc proteins), qui déstabilisent les structures secondaires des ARNm, pour permettre le rétablissement optimal de la synthèse protéique (**Horn et al., 2007**). La deuxième réponse est au niveau membranaire : l'exposition à basse températures engendre la diminution de la fluidité membranaire. La bactérie réagit en augmentant la synthèse des lipides à courtes chaînes carbonées et acides gras insaturés, qui ont une température de fusion plus basse, pour restaurer une fluidité membranaire optimale (**Abee et Wouters, 1999**).

3.7. Stress acide :

Le stress acide est un stress important pour les bactéries lactiques puisqu'elles acidifient leur milieu au cours de la croissance (**Brul et Coot, 1999**). Les acides peuvent diffuser passivement à travers la membrane. Après leur entrée dans le cytoplasme, ils se dissocient

rapidement en protons et en dérivés chargés, auxquels la membrane est imperméable (**Sanders et Huis in't Veld, 1999**).

3.7.1. Effet de stress acide sur les bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques produisent au cours de la croissance de l'acide lactique qui inhibe pour une partie le développement de la flore indésirable dans les produits fermentés (**Shelef, 1994**). Chez plusieurs espèces, L'acquisition de la tolérance au stress acide nécessite aussi des modifications au niveau de la membrane cytoplasmique (**Drici-Cachon et al., 1996**). Il entraîne surtout des défauts lors de la croissance bactérienne. La diminution du pH qui peut atteindre 3,5 à 4,5 et souvent responsable de l'arrêt de la croissance et par conséquent d'augmenter la fraction d'acide lactique sous forme non dissociée qui peut alors diffuser librement à travers la membrane et s'accumule dans la cellule (**Corrieu et Luquet, 2008**). Les bactéries lactiques ne survivent pas à une acidification brutale du milieu. Par contre, cette survie peut être augmentée par une phase d'adaptation à des pH intermédiaire (**Rallu, 1999**)

Conclusion

Les bactéries lactiques (ou ferments lactiques) sont largement utilisées dans la fermentation de nombreux produits alimentaires, en contribuant à la texture, à la saveur des aliments et à la production des composés aromatiques. Ils fermentent les glucides en acide lactique d'où une diminution du pH favorable à la bio-conservation des denrées alimentaires.

Les bactéries lactiques ont la capacité de produire des acides organiques accompagnés de l'abaissement du pH, celui-ci est le majeur facteur par lequel ces dernières inhibent la croissance des autres microorganismes concurrents. D'autres métabolites tels que le peroxyde d'hydrogène, l'alcool, le diacétyle et les bactériocines sont synthétisés par les bactéries lactiques et peuvent aussi contribuer à la préservation des produits alimentaires. Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens produits par certaines souches de bactéries lactiques et dont beaucoup ont une activité contre des bactéries pathogènes. Ces bactériocines ont des atouts indéniables pour représenter une technologie douce de préservation des aliments. Cependant, leur utilisation est soumise à de nombreuses contraintes. Celles-ci sont liées principalement à la production de la bactériocine et de la souche productrice et leur conditionnement, au produit à conserver et à la législation en vigueur pour les bactériocines considérées jusqu'à présent comme des additifs alimentaires.

L'un des intérêts de recherche sur les bactéries lactiques est de développer une stratégie permettant de limiter la croissance des germes indésirables, par l'exploitation des potentialités des bactéries lactiques qui sont capables d'assurer une qualité hygiénique et biopréservative désirable inhibant ainsi les germes nuisibles et toxigènes dans les produits alimentaires.

Les modifications environnementales conduisent à des conditions de croissance non favorables. Le stress acide est le principal stress qui menace la croissance des bactéries lactiques. Ce stress a un effet sur la morphologie, la croissance et la survie des bactéries lactiques. Pour son adaptation, la bactérie doit procéder à une série de réponses génétique.

Les différentes études de l'effet du stress osmotique, acide et thermique sur les cellules montre que l'exposition des bactéries à un stress donné affecte les capacités de se multiplier et

les vitesses de croissance des cellules, elle affecte aussi la survie des cellules viables et cultivables.

Références Bibliographiques

- **Abee T , wouters J.A (1999)**. Microbial stress reponse in minimal processing .Int J Food Microbiol .50 (1-2):65-91 .
- **Alexander H, Grandvalet C, Guilloux-Bénatier M, Romiz-Barnavon F, Tourdot-Maréchale L (2008)**. Les bactéries lactiques en œnologie. Editions TEC & DOC Lavoisier. pp 62.
- **Auffray Y , Gansel X , Thammavongs B , & Boutibonnes P (1992)**.Heat-shock induced protein synthesis in *Lactococcus lactis* subsp .*lactis*.curr .Microbiol 24 :281-284.
- **Axelsson L., 2004**. Classification And Physiology. *In* : Lactic Acid Bacteria: Microbiological And Functional Aspects ((Salminen S., Wright A.V. Et Ouwehand A.). *3e Ed., Marcel Dekker, Inc.* New York. 1-66.
- **Axelsson L.T., Chung T.C., Dobrogosz W.J. Et Lindgren S.E. 1989**. Production Of A Broad Spectrum Antimicrobial Substance By *Lactobacillus Reuteri*. *Microbiol. Ecol. Health Dis.* 2:131-136.
- **Baliarda A (2003)**. Evaluation de la réponse au stress chez les bactéries lactiques appartenant aux genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus*:Approches physiologiques et génétiques. Thèse de doctorat. École doctorale de sciences du vivant.Geosciences, Sciences de l'environnement.
- **Bourgeois C.M. Et Larpent J.P., 1996**. Microbiologie Alimentaire : Aliments Fermentés Et fermentations Alimentaires. *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris. 432-704
- **Bourgeois C. M., Larpent J.P. 1996**. Aliments fermentés et fermentation alimentaire, Microbiologie alimentaires. Tome 2. Ed © Technique Documentation Lavoisier, Paris
- **Booth I.R (2002)**.Le stress et la cellule unique: la diversité d'intrapopulation est un mécanisme pour assurer sa survie lors de l'exposition au stress. *Int. J. Food Microbiol.*78: 19-30.
- **Brul S , & Coote P. (1999)**. Preservative agents in foods. Mode of action and microbiol resistance mechanisms. *Int J Food Microbiol.* 50(1-2):1-17.
- **Caridi, A., Micari P., Caparra P., Cufari A. and Sarullo V. 2003**. Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physico-chemical properties of the ewes' cheese Pecorino del Poro. *International Dairy Journal* 13, 191-200.
- **Carvalho A. S , J. Silva P. Ho, P. Teixeira F. X . Malcata & P. Gibbs (2003)**. Effect of various growth media upon survival during storage of freeze-dried *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus durans*. *J Appl Microbiol.* 94 (6): 947-52.
- **Casaburi, A., Di Monaco, R., Cavella, S., Toldra, F., Ercolini, D., Villani, F. 2008**.Proteolytic and lipolytic starter cultures and their effect on traditional fermented sausages ripening and sensory traits. *Food microbiology*, 25 : 335-347.
- **Cholet O (2006)**. Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire. Institut National Agronomique Paris-Grignon. Ecole Doctorale ABIES. UMR de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires INRA, INA.16.

- **Corrieu G, Luquet MF. (2008).** Bactéries lactiques De la génétique aux ferments. Editions TEC & DOC. Lavoisier. pp : 429-431.
- **Gouesbet G , Jan G , & Boyaval P (2002).** Tow-Dimensional electrophoresis study of *Lactobacillus delbrueckii* subsp .*bulgaricus* thermotolerance .*Appl Environ Microbiol* .68 (3): 1055- 63 .
- **Condon S. 1987.** Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.* 46:269-280.
- **Corrieu, G. & Luquet, F. M. (2008)** Bactéries lactiques : De la génétique au ferment. Paris:Édition Tec et Doc p. 849.
- **Corroler, D., Mangin I., Desmasures N. and Gueguen M., 1998.** An ecological study of lactococci isolated from raw milk in the camembert cheese registered designation of origin area. *Appl Environ Microbiol* 64, 4729-4735.
- **Corroler, D., Desmasures N. and Gueguen M., 1999.** Correlation between polymerase chain reaction analysis of the histidine biosynthesis operon, randomly amplified polymorphic DNA analysis and phenotypic characterization of dairy *Lactococcus* isolates. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51, 91-99.
- **Csonka L.N. (1989).** Physiologie and genetic respons of bacteria to osmotic stress. *Microbiol.Rev.* 53:121-147.
- **Dalmaso, M., Prestoz S., Rigobello V. and Demarigny Y., 2008.** Behavior of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar. *diacetylactisin* a Four *Lactococcus* Strain Starter during Successive Milk Cultures. *Food Science and Technology International* 14, 469-477.
- **De Vuyst, L et Vandamme. J. 1994.** Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* : properties, biosynthesis, fermentation and application.151-221 In L. De Vuyst and E. J. Vandamme (eds.), *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria : Microbiology, Genetics and applications.* Blackie Académie and Professional. London, UK.
- **Deegan, L. H., Cotter. P. D., Hill. C., Ross. P. (2006).** Bacteriocins: biological tools preservation and shelf-life extension. *International. Dairy. Journal.*
- **Dellaglio, F., De Roissart, H., Torriani, S., Curk, M. Et Janssens, C. 1994.** Bactéries Lactiques Aspects Fondamentaux Et Technologiques, 1 : 25-114.
- **Dellaglio F., De Roissard H., Torriani S., Curk M.C. ET JANSSENS D., 1994.** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. *In : Bactéries lactiques (De Roissard H. et Luquet F.M.). Lorica, Uriage.* 1 : 25-116.
- **Delves-Broughton, J. (1990).** Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.* 44,100-117.
- **Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J., Hugenholtz, J. (1996).** Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek* 69, 193–202.
- **Derzelle S , Hallet B , Francis K.P, Ferain T , Delcour J , & Hols P (2000).** Changes in *cspL*, *cspP* and *cspC* mRNA abundance as a function of cold shock and growth phase in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 182:105-5133.
- **Desmazeaud M.J (1998) -** Bactéries Lactiques Et Qualité Des Fromages. Qualité Sanitaire Des Produits Alimentaires. Laboratoire De Recherches Laitières. INRA Paris.
- **Devoyod, J. J et Poullain F. (1988).** Les leuconostoc. Propriétés : Leur rôle en technologie laitière. *Le lait.* 68 (3), 249-280.

- **Dicks, L. M. T., Heunis, D. A., van Staden, D. A., Brand, A., Sutyak Noll, K., and Chinkindas, M. L. (2011)** Medical and personal care applications of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. In: Drider, D., and Rebuffat, S. (Eds). *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer Verlag. Stellenbosch, South Africa. p 391-421.
- **Dortu, C., Et Thonart, P., (2009).** Les Bactériocines Des Bactéries Lactiques: Caractéristiques Et Intérêt Pour.
- **El-Ziney M.G., Jakobsen M. Et Debevere J.M. 1998.** Reuterin. *Nat. Food Antimicrobial Systems*. 24: 17-25.
- **FEDERIGHI M. 2005.** Bactériologie alimentaire compendium d'hygiène des aliments. 2ème Ed, Economica., paris. P 220-224.
- **Galvez, A., Abriouel, H., Lopez, R.L., Ben Oma, N. (2007) -** Bacteriocin-Based Strategies For Food Biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 120(1-2), 51-70.
- **Garry P F. 20010.** Procèdes De Bio-Preservation.
- **Ghalfi,H .2006.**Bacteriocin activity by *L.curvatus* CWBI-B28 to inactivate *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon during 4degrees C storage.*J.Food Protect.*,69:1066-1071.
- **Glaasker E, Heuberger E.H , Konings W.N , Poolman B (1989).** Mechanism of osmotic activation of the quaternary ammonium compound transporter (QacT) of *Lactobacillus plantarum*, *J. Bacteriol* 180 : 5540–5546.
- **Gould G.W. 1991.** Antimicrobial compound. In : *Biotechnology and Food Ingr*
- **Guiraud j.p. 2003.** Microbiologie Alimentaire. Edition DUNOD. P.
- **Guiraud, J.P. et Rosec J.P., 2004.** Pratique des normes en microbiologie alimentaire. *AFNOR*.237- 251.
- **Guiraud, J.P. (1998).** Microbiologie alimentaire. Technique et Ingénierie. Série Agroalimentaire, Eds. Dunod Paris, 652 p.
- **Guillot A , Obis D , Gripon J.C , Renault P, Bolotin A , & Mistou M.Y (2000).** Genetic and biochemical characterization of high-affinity betaine uptake system (BusA) in *Lactococcus lactis* reveals anew functional organization with bacterial ABC transporters. *J.Bacteriol.*, 181: 6238-6246.
- **Guiraud, J.P. et Rosec J.P., 2004.** Pratique des normes en microbiologie alimentaire. *AFNOR*.237- 251. edientseds.Goldberg I. et Williams R. Van Nostrand Reinhold, New York. pp. 461-483.
- **Ggazouani S (2013).**Etude de l'effet du stress induit par chauffage et par irradiation sur *Salmonella*.Universite de la MANOUBA institut superieur de biotechnologie de SIDI THABET.
- **Hancock, R. E. (2000)** Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications. *Expert Opin Investig Drugs*.9: 1723-1729.
- **Haddie J.M., 1986.** Other Streptococci. In : *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology* (Sneathp.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G.W.Et Baltimore W.). 1 : 1070.
- **Hassan A.N., Frank J.F. 2001.** Starter Cultures and their use. In: *Applied Dairy Microbiology* (Marth E.H. et Steele J.L.) 2e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 151-205.

- **Harendeen S , VanBogelon R , Neidhardt F (1979).** Les niveaux de protéines majeures d'*Escherichia coli* lors de la croissance à différentes températures. *J. Bacteriol.* 139: 185-194.
- **Hécharde, Y., Pelletier, C., Cenatiempo, Y., Frère, J. 2001.** Analysis of sigma(54)-dependent genes in *Enterococcus faecalis* : a mannose PTS permease (EII(Man)) is involved in sensitivity to a bacteriocin, mesentericin Y105. *Microbiology*, 147 : 1575-1580.
- **Horn G , Hofweber R , Kremer W , Kalbitzer H (2007).** Structure et fonction des protéines bactériennes de choc à froid. *Cell. Moll. Life Sci.* 64: 1457-1470.
- **Ho T.N.T., Tuan N.N., Deschamps A., Caubet R. 2007.** Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. *Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology.* 134-142.
- **Hogg, T.,(2005).** *Essential Microbiology.* John Wiley & Sons, Ltd. 188-190.
- **Jobin M.P, Françoise D, Dominique G, Charles D, Jean G (1989).** Caractérisation des protéines de choc thermique de faible poids moléculaire chez les bactéries lactiques. *Lait* 78 : 165-171.
- **Jorger MC, Klaenhammer TR 1986.** Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J Bacteriol.* 167, 439-446.
- **Kempf B, Bremer E (1998).** Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress response to high osmolality environment. *Arch. Microbiol.* 17:319-330.
- **Khalid n.m. et marth e.h., 1990.** Lactobacilli, Their Enzymes And Role. In: Ripening And Spoilage of Cheese. *Rev. Dairy Sci.* 73 : 158-167.
- **Kilstrup M , Jacobsen S , Hammer K , Vogensen F.K (1997).** Induction of heat shock proteins DnaK, GroEL and GroES by salt stress *Lactococcus lactis*, *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1826–1837.
- **Kim W S J Ren & N W Dunn (1999).** Differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and subspecies *cremoris* strains by their adaptive response to stresses. *FEMS Microbiol Lett.* 17(1): 57-65.
- **Kim WS, Park JH, Tandianus JE, Ren J & Dunn N W.(2002).** A distinct physiological state of *Lactococcus lactis* cells that confers survival against a direct and prolonged exposure to severe stresses. *FEMS Microbiol Lett.* 212(2): 203-8.
- **Klaenhammer T.R., 1988.** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70, 337-349.
- **Lemay M.J , Rodrigue N , Gariépy C , & Saucier L (2000).** Adaptation of *Lactobacillus alimentarius* to environmental stresses. *Int J Food Microbiol.* 55 (1-3): 249-53.
- **Larpent, J.P. (1997).** *Mémento technique de microbiologie.* 3^{ème} Ed. Technique et Documentation Lavoisier, Paris. Pp 910 .
- **Leclerc H., Gaillard F.L., Simonet M. 1994.** Les grands groupes de bactéries. In: *Microbiologie générale : la bactérie et le monde microbien.* DOIN. Paris. 445
- **Leveau, J.Y., Et Bouix, M., (1993).** *Microbiologie Industrielle : Les Microorganismes D'intérêt Industriel.* Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 85-87.

- **Luchansky J.B. and Call, J.E., 2004.** Evaluation of nisin-coated cellulose casings for the control of *L.monocytogenes* inoculated onto the surface of commercially prepared frankfurters. *J.Food Prot.*, 67 :1017-1021.
- **Luquet, F.M. et Corrieu, G. 2005.** Bactéries lactiques et probiotiques. Edition Lavoisier, Paris. 307 pages .
- **Lourent Federighi M., Jouve J L., 1998.** Manuel de bactériologies alimentaire, polytechnica. Paris : 308p.

- **Lorca G. L. & Font de Valdez G. (1999).** The effect of suboptimal growth temperature and phase on resistance of *Lactobacillus acidophilus* to environmental stress. *Cryobiology*. 39 (2):144-9.
- **Makhloufi K. M. 2012.** Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de doctorat de l'université pierre et marie curie. Spécialité : microbiologie, biochimie (école doctorale iviv)
- **Mozi F., Raya R.R. et Vignolo G.M., 2010.** Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications. *Blackwell. Publishing*. 13.
- **Muthukumarasamy, P., Holley, R.A. 2006.** Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate-microencapsulated *Lactobacillus reuteri*. *International Journal of Food Microbiology*, 111: 164-169.
- **Nigutova M. 2007.** Sequence and structure of a type A lantibiotic (Nisin), a type B lantibiotic (Mersacidin) and a « two-peptides » lantibiotic (Lacticin 3147 A1 and A2).
- **Nigutova K., 2007.** Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of en IA homologues among ruminal Gram+ cocci. *J. Appl. Microbiol.*,102(2), 563-569.
- **Nilsen, T.I.Nes, F and Holo, H.(2003).** Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Applied and Environmental Microbiology* 69:2975-2984.
- **Ogier j.c., casalta e., farrokh c. Et saïhi a., 2008.** Safety Assessment Of Dairy Microorganisms:The *Leuconostoc* Genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126 : 286-290.
- **Parente, E. et Riccardi,A (1999).** Production, recovery and purification of bactériocines from lactic acid bacteria. *Appl.Microbiol. Biotechnol.*52. 628-638.
- **Phadtare S , Yamanata K, & Inouye M (2000) .**The cold shock reponse .In Stortz G.and Hengge-Aronis R .(Eds) . *Bacterial stress Reponse* .ASM press , Washington DC :33-45.
- **Piard J C Et Desmazeaud M. (1991).** Inhibiting Factors Produced By Lactic Acid Bacteria. 1.Oxygen Metabolites And Catabolism End-Products. *Lait*. 71,525-541.
- **Pilet M.F., Magras C., Federigh M. 2005.** Bactéries lactiques. In : bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2e Ed., Economica. Paris. 219-240.
- **Pilet, M.F., Magras C. et Federigh M., 2005.** Bactéries lactiques. In : bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2e Ed., Economica. Paris. 219-240.

- **Piuri M, Sanchez-Rivas C, Ruzal SM. (2003).**Adaptation to high salt in *Lactobacillus*: role of peptides and proteolytic enzyme. *Journal of Applied Microbiology*. 95: 372-379.

- **Pot B., 2008.** The Taxonomy Of Lactic Acid Bacteria. *In* : Bactéries Lactiques De La Génétique Aux ferments (Corrieu G. Et Luquet F.M.). *Tec & Doc, Lavoisier.* Paris.1-106.
- **Pot B. 2008.** The taxonomy of lactic acid bacteria. In: Corrieu G., and Luquet F.M. (Eds). Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments. Lavoisier. Paris, France pp 1–152.
- **Potts M (1994).** Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol Rev.* 58(4):755-805.
- **Prescott et al (2003).** microbiologie.2ème Edition française. Traduction de la 5ème Edition américaine par Claire-Michelle-Bacq-Calberg et Jean Dussart. Edition de Boeck.
- **Rallu F(1999).**Étude de la résistance au stress acide de *Lactococcus lactis* .Thèse de Doctorat,Université Paris VI. France.
- **Rodgers S., 2001.** Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures: a review. *Trends in Food Science and Technology* : 12 : pp 276-284.
- **ROMEO Y, BOUVIER J, GUTIERRE C (2001).** La réponse au stress osmotique des bactéries lactiques *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus plantarum*.*Lait* 81:49-55.
- **Sanders M. E., & Huis in't Veld J. (1999).** Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbial, product, regulatory and labeling issues. *Antonie Van Leeuwenhoek.*76(1-4):293-315.
- **Schleifer, K.H., 1987.** Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Letters.* 46 : 201-203.
- **Schöbitz, R., Suazo, V., Costa, M., and Ciampi, L. (2003)** Effects of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Carnobacterium piscicola* against human and salmon isolates of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.*84: 237-244.
- **Stiles M.E. & Holzapfel W.,(1997)** - Lactic Acid Bacteria Of Foods And Their Current Taxonomy.*Int. J.Food Microbiol.* 36(1), 1-29.
- **Stiles, M. and Holzapfel, W. 1997.** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36, pp: 1-29
- **Tamime a.y., 2002.** Microbiology Of Starter Cultures. In: Dairy Microbiology Handbook (Robinsonr.K.). *3e Ed., John Wiley And Sons, Inc.,* New York. 261-366.
- **Talralile S , Zouyed M (2014).** Etude de la réponse au stress acide chez les bactéries lactiques.
- **Thompson, J. et Gentry-Weeks C.R. 1994.** Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. *In* : De Roissart H. et Luquet F.M., Bactéries lactiques. *Lorica, Uriage.* 1 : 239-290.
- **Todorov S.D. & Dicks L.M., 2004.** Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin by *Lactococcus lactis subsp. lactis* ST34BR, a strain isolated from barley beer. *J. Basic Microbiol.*, 44, 305-316.
- **Tosukhowong, A., Nakayama J., Mizunoe Y., Sugimoto S., Fukuda D. et Sonomoto K., 2005.**Reconstitution and function of *Tetragenococcus halophila* chaperonin 60 tetradecamer. *J.Biosci.Bioengin.* 99: 30-37.
- **Van de Guchte , Serror M.P , Chervaux C , Smokvina T , Ehrlich S.D , & Maguin E (2002).** Stress reponses in lactic acid bacteria .*Antonie van leeuwenhoek* .82 (1-4) :187-216.

- **Wallace, T. D., Bradley, S., Buckley, N. D. & Green-Johnson, J. H. (2003).** Interactions of lactic acid bacteria with human intestinal epithelial cells: Effects on cytokine production. *Journal of Food Protection* 2003. Vol. 66 (3) : 466-472.
- **Wijaya et al.(2006).** In Les bactériocines des bactéries lactiques caractéristiques et intérêts pour la bio conservation des produits alimentaires. Base. Volume13.
- **Whitaker R.D , Batt C.A (1991).**Characterization of the heat shock reponse in *Lactococcus lactis* subsp . *lactis* . *AppI .Environ.Microbiol* 57 : 1408-1412 .
- **Xie X., Qiu WG. et Lipke PN. 2011.** Accelerated and adaptive evolution of yeast sexual adhesins. *Mol Biol Evol* 28(11):3127-37.
- **Yang, Z. (2000).** Antimicrobial compound and extracellular polysaaharides produced by lactic acid bacteria: Structures and properties. MSc Thesis, Faculty of Agriculture and Forestry, Department of Food Technology University, University of Helsinki. 61p.
- **Yateem A., Balba M T., AL-Surrayai T., Al-Mutairi B. and Al-Daher R., 2008.** Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk. *International. Journal of Dairy. Science* : 3(4): pp 194-199.
- **Zalan Z., Barath A et Halasz A. 2005.** Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains. *Food Technol. Biotech.* 43(3): 219- 225
- **Zhang H. et Cai Y., 2014.** *Lactic Acid Bacteria Fundamentals and Practice.* Springer Dordrecht Heidelberg. New York London. 536p.