



République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique

جامعة زيان عاشور-الجلفة

Université Ziane Achour -Djelfa

كلية علوم الطبيعة و الحياة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

قسم العلوم البيولوجية

Département de Biologie

Projet de fin d'étude

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Biologie

Spécialité : Microbiologie appliquée

Thème :

Etude bibliographique sur la production des bactériocines par les bactéries lactiques

Présenté par :

Boudaoued Kahina
Sehaki Rania Sonia

Soutenu devant le jury :

Président	Mr. REBHI Abdelghani	MCA	U-Djelfa
Examineur	Mr. MESTFAOUI Abdullah	MCA	U-Djelfa
Examineur	Mr. BELARBI Mohammed	MAA	U-Djelfa
Encadreur	Mr. MAHI Mohammed	MAA	U-Djelfa

Année Universitaire 2020/2021

Remerciements

Avant tous, nous tenant à remercier ALLAH, qui nous a donné la patience et l'aide et le courage pour dépasser toutes les difficultés durant nos études.

Nous voudrions également adresser nos remerciements à monsieur Mahi Mohamed pour sa patience, sa disponibilité, son aide, et surtout ses conseils précieux, qui nous a donné le courage afin de mener notre travail à bon port.

On aimerait saisir cette occasion pour remercier les membres du jury tout en espérant qu'ils trouveront dans ce projet de fin d'études les qualités de clarté et de motivation qu'ils attendent.

Nous remercions l'ensemble des enseignants du département de biologie.

Enfin nous remercions tous ceux qui ont contribué de près et de loin à la réalisation de ce modeste travail.



Dédicace

Je dédie ce travail

*A ma chère mère **MEZHOURA** et à mon cher père **RABAH***

Les deux personnes les plus précieuses au monde

Qui m'ont appris tout ce que je sais

Qui m'ont guidé vers le tunnel éclairé du savoir

Qui m'ont nourri d'amour, enveloppé de confort

Qui m'ont encouragé durant tout mon cursus universitaire.

Je souhaite qu'ils soient heureux pendant toute leur vie.

*A mes sœurs **TITEM, KARIMA** et **LILA***

*A mes frères **HAMID** et **AKLI***

Auxquels je souhaite beaucoup de réussite et tout le bonheur du monde.

A tous les membres de ma famille : mes beaux-frères et mes belles-sœurs, À tous mes neveux et nièces

*A mes amis **IMANE** et **IBTISSEM***

A mes collègues de promotion microbiologie appliquée 2020/2021

BOUDAUD Kahina

Dédicace

C'est grâce à Dieu ﷻ, « le tout puissant qui m'a donné le courage et la volonté et le savoir pour achever ce modeste travail.

Je dédie avec tout mon cœur :

A mon très cher Papa l'homme précieux dans ma vie et ma très chère Maman qui a souffert sans me laisser souffrir, pour leurs sacrifices, leur soutien moral,, de leurs encouragements tout au long de mes études et durant ce mémoire, ils m'ont offert tout l'Amour j'espère qu'ils sont fières de moi.

A mon cher grand père que bénisse son amé et lui fasse l'un des gens de paradis inchalah.

*Je dédie aussi ce mémoire à ma très chère tante **TATA HAMIDA**, pour son encouragement et ma chère cousine **NESRINE**.*

SEHAKI Rania Sonia

Sommaire :

Liste des tableaux	I
Liste des figures	II
Liste des abréviations	III
Introduction.....	1
CHAPITRE I. LES BACTÈRE LACTIQUE	2
1 Historique	2
2 Taxonomie	2
3 Classification.....	5
4 Principaux genres des bactéries lactiques	6
4.1 <i>Lactobacillus</i>	6
4.2 <i>Lactococcus</i>	7
4.3 <i>Enterococcus</i>	8
4.4 <i>Pediococcus</i>	8
4.5 <i>Streptococcus</i>	8
4.6 <i>Les bifidobactéries</i>	8
5 Intérêt des bactéries lactique	9
5.1 Dans l'industrie alimentaire.....	9
5.1.1 Les principales utilisations des bactéries lactiques en alimentation humaine	10
5.1.1.1 Produits laitiers	10
5.1.1.2 Produits carnés	11
5.1.1.3 Produits de pêche	11
5.1.1.4 Produits végétaux	12
5.1.2 Rôle des bactéries lactiques dans la conservation.....	13
5.1.2.1 Production d'acide lactique : Les bactéries lactiques ont un rôle important dans l'inhibition des flores non lactiques.	13
5.1.2.2 Production de bactériocines : Ces peptides antimicrobiens sont synthétisés par un très grand nombre de souches de bactéries lactique, elles sont généralement thermorésistantes.	13
5.2 Dans le domaine thérapeutique	13
7 Les bactéries lactiques comme probiotiques	14
7.1 Définition des probiotiques.....	14
7.2 Microorganismes probiotiques.....	14

7.3	Les probiotiques et leurs effets bénéfiques sur la santé	15
8	Les facteurs inhibiteurs produits par les bactéries lactiques	16
8.1	Les acides organiques	16
8.2	Le peroxyde d'hydrogène	17
8.3	Le dioxyde de carbone.....	17
8.4	Le diacétyl.....	17
8.5	La reutéline	17
8.6	Les bactériocines	17
9	Propriétés technologiques des bactéries lactiques.....	18
9.1	Aptitude acidifiante	18
9.2	Aptitude texturante.....	18
9.3	Aptitude aromatisante.....	18
9.4	Activité antimicrobienne	19
	CHAPITRE II. LES BACTERIOCINES	20
1.	Généralités	20
2.	Bactériocines.....	20
3.	Biologie des bactériocines.....	20
4.	Classification des bactériocines.....	21
4.1.	Classe I : Les lantibiotiques	21
4.1.1.	Le type A linear.....	21
4.1.2.	Le type B globulaires	21
4.1.3.	Lantibiotiques de type C multi-composants	22
4.2.	Classe II peptidiques.....	23
4.2.1.	La Sous classe IIa	23
4.2.2.	La Sous classe IIb	23
4.2.3.	La Sous classe IIc	23
4.3.	Classe III protéiques	23
4.3.1.	Type IIIa	24
4.3.2.	Type IIIb	24
4.4.	Classe IV complexes	27
4.4.1.	Entéroline AS-48.....	27
4.4.2.	Gasséricine A et Reutéricine 6.....	27
4.4.3.	Uberolysine	27

5. Biosynthèse et régulation de la production des bactériocines.....	30
5.1. La biosynthèse des lantibiotiques.....	30
5.2. Biosynthèse des bactériocines de classe II	32
5.3. La biosynthèse des bactériocines de classe III.....	33
5.4. La biosynthèse des bactériocines de la classe IV.....	33
6. Mécanisme d'action des bactériocines	33
6.1. Les lantibiotiques	33
6.2. Les bactériocines de classe II.....	35
6.2.1. Le mécanisme d'action supposé des bactériocines de classe IIa.	35
6.2.2. Les bacteriocines de classe IIb.....	36
7. Biologie moléculaire des bactériocines.....	37
8. Auto-immunité.....	37
8.1. Immunité aux lantibiotiques	38
8.2. Immunité aux pédiocines	38
8.3. Immunité aux bactériocines de classe IIb.....	39
9. Résistance aux bactériocines	40
10 Applications des bactériocines	41
10.1 Dans l'industrie alimentaire	41
10.2 Dans Applications cliniques	43
11 Facteurs influençant la production des bactériocines	45
CHAPITRE III.	46
1. Mise en évidence de l'activité bactériocinogène	46
1.1. Test des spots (spot on the lawn)	46
1.2. Méthode des puits.....	46
1.3. Méthode des disques.....	47
1.4. Méthode de plaques.....	47
1.5. Méthode des microplaques	47
2. Méthodes de purification des bactériocines.....	47
2.1. Précipitation au sulfate d'ammonium.....	47
2.2. Adsorption-désorption.....	48
2.3. Dialyse	48
2.4. Ultrafiltration	48
2.5. Lyophilisation	49

2.6. Electrophorèse sur gel polyacrylamide en présence de SDS	49
2.7. chromatographie d'exclusion stérique (gel-filtration).....	49
Conclusion	50
Résumé.....	51
Références	53

Liste des tableaux

Tableau 1. Taxonomie et les clés de différenciation des bactéries lactiques.....	5
Tableau 2. Différentes utilisation des bactéries lactique en alimentation	9
Tableau 3. Facteurs influant sur la maîtrise des bactéries lactiques.	10
Tableau 4. Les principaux produits issus de la fermentation des bactéries lactiques	12
Tableau 5. Utilisation des bactéries lactiques dans la fermentation alimentaire	14
Tableau 6. Principales ecpèces microbiennes comme probiotiques	15
Tableau 7. Effets positifs des probiotiques sur la santé	16
Tableau 8. Quelques bactériocines distinctive de classe II et leur caractéristique.....	25
Tableau 9. La classification de quelques bactériocines des bactéries lactiques	28
Tableau 10. La classification de quelques bactériocines des bactéries lactiques	30
Tableau 11. Facteur influençant l'activité de la bactériocine dans l'aliment.	42

Liste des figures

Figure 1. Dendrogramme illustrant les relations phylogénétiques de l'ordre "Lactobacillales"4	
Figure 2. Arbre phylogénétique des bactéries lactiques	6
Figure 3. Séquence et structure de lantibiotiques de type A	22
Figure 4. Schéma de classification proposé	29
Figure 5. Régulation de la production, modifications post-traductionnelles et auto-immunité de la nisine	31
Figure 6. ABC-transporteur avec le domaine protéasique	32
Figure 7. Schéma de la biosynthèse de la production des bactériocines de la sous classe IIa.33	
Figure 8. Mode d'action des bactériocines de bactéries lactiques.	34
Figure 9. Mécanisme d'action de la nisine	34
Figure 10. Représentation schématique de la structure d'un modèle de bactériocine de classe IIa.....	35
Figure 11. Modèle d'interaction de la lactococcine G avec la membrane	36
Figure 12. Modèle de destruction et d'immunité des cellules cibles pour la lactococcine A ..	38
Figure 13. La structure tridimensionnelle de l'immunité protéine (entA-im)	39
Figure 14. Bactériocine associée à Abi et loci de type bactériocine	40
Figure 15. Applications sélectionnées des bactériocine	44
Figure 16. Différents domaines des applications des bactériocines des bactéries lactiques....	44
Figure 17. Les facteurs influençant la production et l'activité de la bactériocine.	45

Liste des abréviations

LMM: Low Moléculair Compound

HMM: High Masse Moléculair compound

GSP : G. Sinense Polysaccharide

PTS : Perméase du Système Man

SARM : Le Staphylococcus Aureus
Résistant à la Méthicilline

ERV : Entérocoque Résistant à la
Vancomycine

PEG : Polyéthylène glycol

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

ATP : Adénosine Triphosphate

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

FAO : L'Organisation des Nations unies
pour l'alimentation et l'agriculture

Sec : Secretion System Complex

SRP : Signal Recognition Particle

ABC : ATP Binding Cassette

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

Introduction

Les bactéries lactiques sont connues pour leur aptitude à produire des composés antibactériens leur permettant de se développer préférentiellement dans divers écosystèmes. Parmi les substances synthétisées, des peptides, dénommés bactériocines, sont produits puis exportés à l'extérieur des cellules productrices. Ils présentent un spectre d'activité plus ou moins large, quelquefois limité aux espèces proches phylogénétiquement des bactéries productrices. Ces bactériocines font l'objet depuis une dizaine d'années d'un nombre croissant d'études, ainsi qu'en témoigne l'abondante littérature scientifique s'y rapportant. Les bactéries lactiques ont été, depuis longtemps, un outil de conservation et de transformation des aliments, en dépit de l'ignorance de ces potentiels technologiques.

Elles étaient présentes dans de nombreux écosystèmes microbiens, car elles ont la particularité de prédominer dans des environnements assez riches tels que le lait et ses dérivés, les végétaux et dans les cavités humaines et animales.

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale. Elles sont impliquées dans un grand nombre de fermentations spontanées de produits alimentaires, ce qui a conduit à la reconnaissance de leur statut GRAS (Generally Recognized As Safe). Actuellement, les bactéries lactiques regroupent treize genres bactériens différents : *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus*. Elles sont principalement utilisées en tant que starter dans les produits alimentaires fermentés où elles permettent de développer certaines caractéristiques organoleptiques et d'augmenter la durée de conservation.

En effet, les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutéline, le diacétyl et les bactériocines. Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens inhibant la croissance de bactéries altérantes ou pathogènes. 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.

Le corps de ce mémoire comporte trois chapitres. Le premier chapitre consiste la structure et l'histoire des bactéries lactiques et leurs propriétés. Le chapitre 2 expose et parle des bactériocines leur importance et leurs applications et aussi leurs méthodes de purification.

CHAPITRE I. LES BACTÈRIE LACTIQUE

1 Historique

Les bactéries lactiques sont de très anciens micro-organismes découverts dans des sédiments datant de 2,75 milliards d'années, avant l'apparition de l'oxygène dans l'atmosphère ce qui pourrait expliquer leur caractère anaérobie (**Quiberoni et al., 2001**). Elles sont apparues avant les cyanobactéries photosynthétiques (**Drider & Prevost , 2009**).

L'utilisation de la fermentation par l'Homme remonte à des temps très anciens. Les premiers produits fermentés ont certainement été obtenus par acidification spontanée des jus végétaux (vins, bières...) ou par contamination naturelle du lait (yaourts, fromages...). Les premières preuves de l'existence des produits laitiers fermentés remontent à 8000 ans avant JC dans le croissant fertile au Moyen Orient (plaines du Nil, du Jourdain, de l'Euphrate et du Tigre), époque où les végétaux et les animaux sont domestiqués (**Fox, 1993**). La fermentation des végétaux (vins, bières) et la production de levain apparaissent entre 4000 et 2000 avant JC chez les Égyptiens. La fermentation est réalisée à partir de différents types d'aliments : des végétaux (concombres, betteraves, dattes, jus de fruits, soja, etc.), des produits animaux (viande, lait) ou du poisson. Elle permet de conserver les aliments mais aussi de leur donner une saveur différente du produit original.

Il faudra attendre Pasteur et ses travaux sur la fermentation en 1857 pour établir un lien entre la fermentation lactique et les bactéries. La première culture bactérienne pure sera d'ailleurs une culture de *Lactococcus lactis* obtenue et décrite par Joseph Lister en 1873 cité par Penaud (2006). Metchnikoff isole en 1904 le « bacille bulgare » (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) présent dans le yaourt. Il étudie les propriétés acidifiantes des bactéries du yaourt et il développera l'idée que les bactéries contenues dans les laits fermentés ont un effet bénéfique sur la santé (**Metchnikoff, 1907**). Il plaidera en faveur de l'introduction de produits laitiers fermentés dans le régime alimentaire et en 1905, les premières entreprises fabricant du yaourt à partir des souches de l'Institut Pasteur voient le jour (**Bibel, 1988**).

De nos jours les bactéries lactiques représentent le deuxième plus grand marché de production de biomasse, après les levures. Principalement utilisées lors d'application dans l'industrie alimentaire, comme la fabrication des fromages, des laits fermentés. De certains légumes et produits cranés fermentés et de certains vins. Elles interviennent aussi dans l'industrie chimique pour la production d'acide lactique et de biopolymères et acquièrent.

2 Taxonomie

Décrites pour la première fois par Orla-Jensen au début du XXe siècle (1919), les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique.

Les critères utilisés (morphologie cellulaire, types fermentaire, les températures de croissance et l'utilisation des sucres) sont toujours très importants pour la classification des BL, bien que l'avènement d'outils taxonomiques plus modernes, les méthodes biologiques en particulier moléculaires, ont considérablement augmenté le nombre de genres de BL à partir des quatre initialement reconnue par Orla-Jensen (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus*) (Lahtinem *et al.*, 2012).

Une importante étape a été franchie en 1977 par Woese et Fox qui ont introduit la phylogénie moléculaire basée sur la séquence des ARN ribosomiques. Cette méthode a révolutionné la taxonomie des bactéries et la classification des BL a été profondément modifiée. D'autres méthodes génotypiques (basés sur les acides nucléiques) sont aussi utilisées en classification, comme le pourcentage en GC de l'ADN ou l'hybridation ADN:ADN. (Salminen *et al.*, 2004).

L'ancien genre *Streptococcus* était divisé au début en trois groupes : *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus* sensu stricto, mais aujourd'hui, certaines bactéries lactiques qui étaient mobiles, ressemblant aux *Lactococcus*, ont formé un autre genre séparé ; c'est les *Vagococcus*. Les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* sont globalement restés inchangés, mais quelques bactéries lactiques, auparavant incluses dans le genre *Lactobacillus*, forment maintenant le genre *Carnobacterium* qui regroupe des lactobacilles atypiques isolés de différents produits carnés. De plus, des souches de l'ancienne espèce *Pediococcus halophilus* ont été incluses dans le genre *Tetragenococcus* du fait de leur insensibilité à la Vancomycine. Quelques espèces de *Lactobacillus* et *Leuconostoc* ont formé un nouveau genre, les *Weissella*, en raison de leurs différences phylogénétiques avec les autres lactobacilles hétérofermentaires. Les *Leuconostoc oenos*, les « *Leuconostoc* du vin », ont formé le genre *Oenococcus* (Axelsson, 2004).

Le genre *Bifidobacterium* est considéré comme appartenant aux bactéries lactiques (du fait de son effet probiotique sur l'organisme et son utilisation dans les aliments) mais il est phylogénétiquement sans rapport avec ces dernières (Vandamme *et al.*, 1996).

Selon la dernière édition de *Bergey's manual of systematic bacteriology* (2009), les bactéries lactiques sont classées dans le Phylum des **Firmicutes**, la Classe des **Bacilli** et l'Ordre des **Lactobacillales** renfermant trente-cinq genres (*Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*,..... (Pot, 2008)) Répartis sur six familles (Fig.02)

D'autres genres, par exemple : *Dolosicoccus*, *Dolosigranulum*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Globicatella*, *Helococcus*, *Ignavigranum* et *Lactosphaera*, ont également été décrits, comportant des souches qui montrent des liens physiologiques et phylogénétiques avec les bactéries lactiques (Broadbent, 2001).

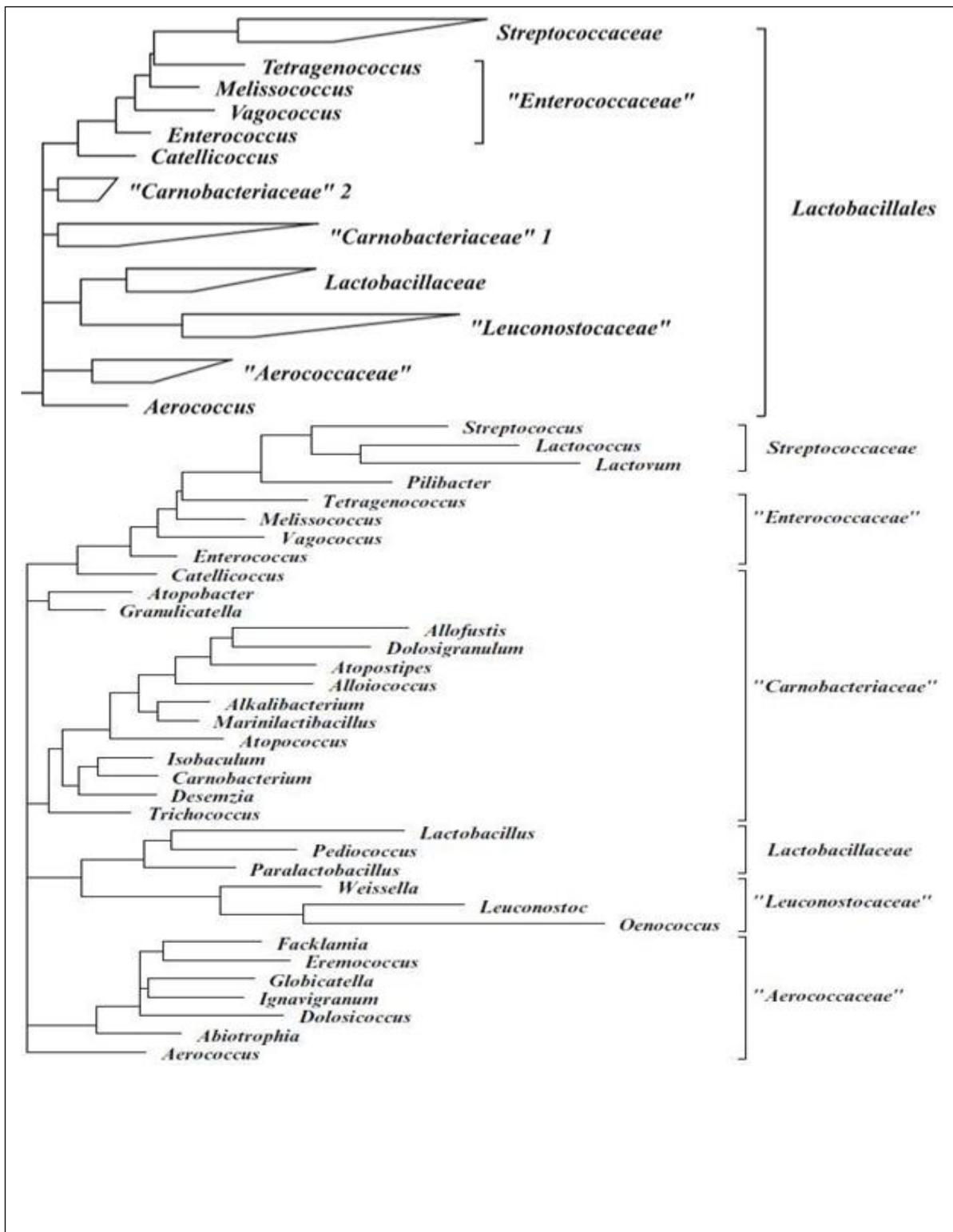


Figure 1. Dendrogramme illustrant les relations phylogénétiques de l'ordre "Lactobacillales" en se basant sur la comparaison des séquences d'ARNr 16S « *Bergey's manual of systematic bacteriology* (2009) ».

Tableau 1. Taxonomie et les clés de différenciation des bactéries lactiques (**Holzapfel et al., 2001**).

Genus	Shape	Catalase	Nitrite reduction	Fermentation	Current genera
Betabacterium	Rod	-	-	Hetero-	<i>Lactobacillus</i> <i>Weissella</i>
Thermobacterium	Rod	-	-	Homo-	<i>Lactobacillus</i>
Streptobacterium	Rod	-	-	Homo- and hetero-	<i>Lactobacillus</i> <i>Carnobacterium</i>
Streptococcus	Coccus	-	-	Homo-	<i>Streptococcus</i> <i>Enterococcus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Vagococcus</i>
Betacoccus	Coccus	-	-	Hetero-	<i>Leuconosto</i> <i>Oenococcu</i> <i>Weissella</i>
Microbacterium	Rod	+	+	Homo-	<i>Brochothrix</i>
Tetracoccus	Coccus	+	+	Homo-	<i>Pediococcus</i> <i>Tetragenococcus</i>

3 Classification

La première classification des bactéries lactiques a été établie en 1919 par Orla- Jensen. Elle est basée sur les caractéristiques observables telles que les propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques. Les marqueurs chimiotaxonomiques, comme la composition des acides gras et les constituants de la membrane cellulaire, ont été également utilisés pour la classification.

Les bactéries lactiques appartiennent à la lignée des firmicutes, à la classe des bacilli, et à l'ordre des *lactobacilles*. D'après **Ludwig et al. (2008)**, les bactéries lactiques sont divisées en trois familles :

- ❖ Famille des *Lactobacillaceae* comportant les *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* et *Pediococcus*.
- ❖ Famille des *Leuconostocaceae* contenant les *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*.
- ❖ Famille des *Streptococcaceae* comprenant les *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Lactovum*.

La classification actuelle des bactéries lactiques fait apparaître douze genres : *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*. (**Stiles & Holzapfel, 1997**). Sur la base des données de séquençage de 16S et 23S de l'ADNr, les bactéries Gram positives forment deux embranchements. Un embranchement composé de bactéries Gram

positives avec un pourcentage G + C inférieur à 50% (*Clostridium*) et un autre formé de bactéries ayant une teneur en G + C supérieure à 50% (Actinomycètes) (**Holzapfel et al., 2001**). Les bactéries lactiques typiques ont une teneur en G + C inférieure à 50% alors que le genre *Bifidobacterium* qui, d'un point de vue physiologique, fait partie des bactéries lactiques, appartient à la branche des Actinomycètes qui comprend aussi *Propionibacterium* et *Brevibacterium* (**Vandamme et al., 1996**).

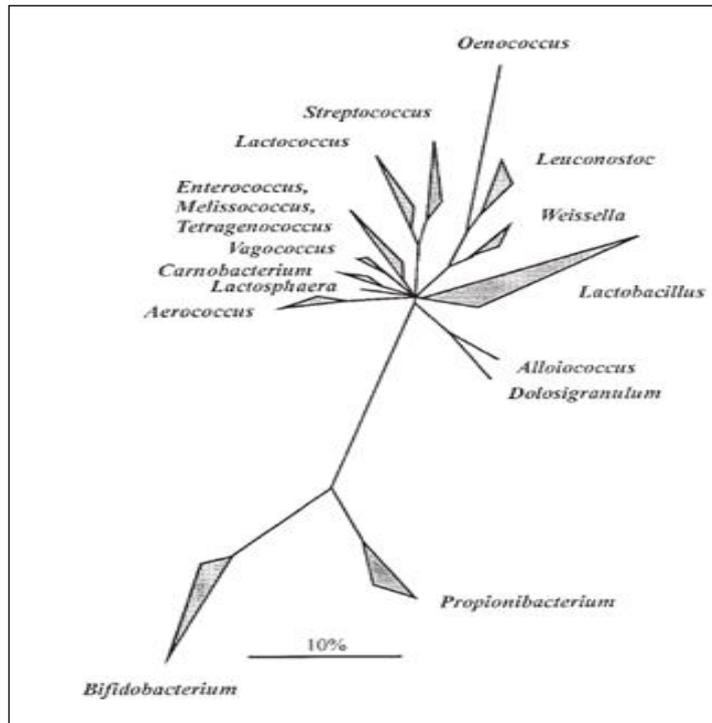


Figure 2. Arbre phylogénétique des bactéries lactiques (**Holzapfel et al., 2001**).

La barre indique une divergence de séquence estimée de 10%. Les bactéries à base G+C (en haut) sont phylogénétiquement éloignées des bactéries à haut G+C (en bas). Sont soulignés en rouge les genres pour lesquels la séquence d'au moins un génome est disponible, en vert ceux pour lesquels au moins un génome est en cours de séquençage.

4 Principaux genres des bactéries lactiques

4.1 Lactobacillus

Les lactobacilles sont des bactéries à Gram positif, microaérophiles se trouvant couramment dans une grande diversité environnementale, y compris les environnements laitiers riches en éléments nutritifs, les habitats microbiennes d'hôtes tels que les muqueuses humaines, ainsi que les niches écologiques naturels tels que les plantes et le sol. Le genre *Lactobacillus* appartient au phylum Firmicutes, la classe des Bacilli, et l'ordre des Lactobacillales (**Barrangou et al., 2012**).

Le genre comprend plus de 145 espèces dont la majorité sont liées à l'homme ou utilisées pour la fermentation industrielle des produits laitiers et autres produits alimentaires (**Kant et al., 2011**). Ils peuvent être isolées du tractus gastro-intestinal (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, etc.), des plantes (*Lactobacillus plantarum*, etc.), de la viande (*Lactobacillus brevis*, etc.) et les produits laitiers (*Lactobacillus bulgaricus* et *Lactobacillus casei*) (**Savadogo et al., 2011**). Les cellules se présentent sous la forme de bâtonnets longs et fins, ou très courts, incurvés et même ovoïdes et

souvent en chaînette, non sporulées et généralement non mobiles. La température et le pH de croissance optimaux sont généralement de 30 °C à 40 °C et de 5,5 à 6,2, respectivement. Elles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, en vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux (Tailliez . 2004). La taille du génome des *Lactobacilles* varie entre 1.8 et 3.3 Mpb. *Lactobacillus salivarius subsp salivarius* a le génome le plus petit avec 1.8 Mpb codant pour 1562 protéines, 73 gènes non traduits, 3 plasmides et 78 gènes d'ARNt. *Lactobacillus plantarum* a le génome le plus grand avec 3.3 Mpb et code pour 3052 protéines, 39 gènes non traduits, 3 plasmides et 62 gènes d'ARNt (Pfeiler & Klaenhammer, 2007). En fonction de la température de croissance, des caractères morphologiques et de la fermentation des hexoses (homofermentaire et hétérofermentaire), Orla Jensen (1919) a proposé de divisé le genre *Lactobacillus* en trois groupes (Salveti *et al.*, 2012) .

Groupe 1 : *Thermobacterium*

Regroupe les espèces homofermentaires strictes (*Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, etc.) qui utilisent la voie d'Embden-Meyerhof pour convertir une molécule d'hexose en deux molécules de lactate. Ces bactéries possèdent une aldolase qui convertit le fructose-1,6 diphosphate en deux molécules de triose-3 phosphate. Elles sont incapables de fermenter les pentoses et les gluconate (manque de phosphocétolase).

Certaines de ces espèces sont d'une grande importance pour le fromage, le yaourt et les boissons probiotiques (Pfeiler & Klaenhammer, 2007).

Groupe 2 : *Streptobacterium*

Regroupe les espèces hétérofermentaires facultativement (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus*, etc.) qui métabolisent les hexoses par la voie glycolytique Embden Meyerhof. Ces bactéries possèdent à la fois l'aldolase et de la phosphocétolase et par conséquent, fermentent non seulement l'hexose mais aussi les pentoses (et souvent le gluconate). En présence de glucose, les enzymes de la voie des phosphogluconates sont réprimées. Plusieurs espèces sont traditionnellement associées aux aliments fermentés et à l'ensilage (Batt, 2000).

Groupe 3 : *Betabactruum*

Regroupe les *Lactobacilles* hétérofermentaires stricts (*Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus brevis*, etc.), ainsi les hexoses sont fermentés par la voie du phosphogluconate produisant du lactate, de l'éthanol (acide acétique) et du CO₂ en quantités équimolaires. Les pentoses peuvent entrer dans cette voie et être fermentés. Elles se trouvent dans le tractus gastro-intestinal et sont associées à une gamme de denrées alimentaires, notamment le fromage affiné. (Limsowtin *et al.*, 2002).

4.2 Lactococcus

Le genre *Lactococcus* comprend sept espèces , morphologiquement les *lactoquoques* sont des coques à Gram positif de 0,5-1,5 µm, formant des chaînes courtes. Elles sont mésophiles, capables de fermenter les hexoses par voie homofermentaire, produisant de l'acide lactique L (+), et ont des exigences complexes pour sa croissance (Kim, 2014). Les *Lactocoques* ont été isolés à partir des végétaux (Cai *et al.*, 2010 ; Carr *et al* 2002), du lait, ou à partir d'autres sources animales, y compris l'intestin humain (Kubota *et al.*, 2010). La bactériocine

découverte en 1927, nommée «Nisine» produite par *Lc. Lactis* est utilisée de façon courante comme additif alimentaire (E234) pour la conservation de certains aliments, dont celle de la viande. Elle est par ailleurs la seule bactériocine pouvant légalement être utilisée comme agent de conservation.

4.3 Enterococcus

Les entérocoques sont des cocci ovoïdes à Gram positif se présentant isolés, en paires, en chaînes courtes ou elles peuvent être disposés en groupes en particulier si la morphologie des cellules est étudiée à partir des cultures cultivées sur un support solide. Les cellules sont souvent allongées dans la direction de la chaîne. Les entérocoques peuvent jouer un rôle bénéfique dans la maturation et le développement de l'arôme de certains produits alimentaires traditionnellement fermentés tels que les fromages et la charcuterie. Elles sont également utilisées comme probiotiques humains, pour traiter les maladies diarrhéiques causées par des pathogènes d'origine alimentaire (Svec & Franz, 2014).

4.4 Pediococcus

Les pédiocoques sont des bactéries à Gram positif, oxydase-négatives et catalase négative. Elles sont immobiles, se révèlent autant que cellules sphériques d'une taille uniforme et se disposent comme tétrades par autre division perpendiculaire en deux directions (Gunther & Blanc, 1961).

4.5 Streptococcus

Les membres du genre *Streptococcus* sont Gram positif, catalase négative, anaérobie facultatif ont la forme sphérique ou ovoïde, moins de 2µm de diamètre et un faible contenu en G +C. Les streptocoques ne sont pas mobiles et ne forment pas de spores. La température optimale de croissance est habituellement d'environ 37°C, mais des températures de croissance minimale et maximale peuvent varier entre les espèces. Beaucoup d'entre elles sont commensales de l'homme et les animaux, et certaines sont hautement pathogènes (Whiley & Hardie, 2009).

4.6 Les bifidobactéries

Sont des bacilles à gram positif, non mobiles, ne produisent pas du gaz et ne forme pas de spores. Elles sont des anaérobies mais quelques espèces tolérant l'O₂ dans la présence ou non du CO₂. Ces dernières sont dépourvues de la catalase, le contenu en G +C est de 61% (Mattarelli & Biavati, 2014). Les bifidobactéries sont des bactéries commensales de l'homme, elles sont également retrouvées chez les animaux (Biavati *et al.*, 2000). Les conditions optimales de croissance des bifidobactéries d'origines humaine se situent à des températures comprises entre 37°C et 41°C, et des valeurs de pH entre 6,5 et 7 (Hadadji, 2007).

5 Intérêt des bactéries lactique

5.1 Dans l'industrie alimentaire

De très nombreux alimentaire subissent une fermentation lactique avec leur consommation, ce qui leur assure des caractéristiques bien particulières d'arôme et de texture, mais aussi une bonne sécurité alimentaire grâce aux acide organique produits. Les bactéries qui en sont responsable sont tout regroupées sous la même application de (bactéries lactiques), bien que ce terme concerne des germes très différents (**Tableau 2**).

Tableau 2. Différentes utilisation des bactéries lactique en alimentation (**Biavati et al., 2000**).

Différentes utilisations des bactéries lactiques en alimentation

Produits laitiers : fromages, yaourts, laits fermentés, kéfirs

Lactococcus lactis subsp. *Lactis* et bionar *diacetylactis* lc. *Lactis* subsp. *cremoris*,
Leuconostoc mesenteroides, *Leuc.lactis* *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus Faecium*
Lactobacillus helventicus, *Lb.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et subsp. *Lactis* *Lb. Acidophilus*,
Lb. Casei, *Lb. Kefir*, *Lb. Hilgardii*

Bifidobacterium bifibum, *Bf. Longum*

Fermentation des produits végétaux : <<pickles>>, choucroute, <<miso>> , <<gari>>,
olives *lactobacillus plantarum*, *Lb. brevis*, *leuconostoc mesenteroides pediococcus*
pentosaceus, *Pd. damnosus*

Pains spéciaux aux levains

Lactobacillus plantarum, *Lb. brevis*, *Lb. fermentum*, *Lb. sanfrancisco*

Fermentation des produits carnés

Carnobacterium divergens, *Cb.piscicola*

Lactobacillus sake, *Lb. curvatus*

Fermentation des produits de la pêche

Pediococcus halophilus, *Lactobacillus buchneri*, *Lb. brevis*

Leuconostoc mesenteroides

Boissons : vin, bière, cidre

Leuconostoc oenos (= *Oenococcus orni*), *Lactobacillus delbrueckii*

Dans certain nombre de cas, la fermentation lactique est spontanée, et la qualité des produits finaux obtenus est très variable. Aussi, au fur et à mesure de l'industrialisation de certain fabrication, les technologues ont fini par bien connaître ces bactéries et les utilisent dans les conditions définies, après sélection de souche spécialement adaptées aux fabrications (**Tableau 3**) ; ils cherchent actuellement à leur appliquer les techniques récentes du génie génétique afin de mieux encore les exploiter.

Ainsi, tous les types de produits alimentaires sont concernés. Dans les produits animaux, le lait est transformé en fromages, crèmes de beurre, yaourts et autres laits fermentés. La viande conduit à des saucisses fermentées ou à des produits saumurés secs, le poisson à différentes préparations. Les produits végétaux subissent aussi, dans de nombreux pays pour toutes les latitudes, une fermentation lactique qui est impliquée dans la fabrication des boissons (vins, bière, cidre), des pains, dans la transformation du soja, du chou en choucroute ou de différents végétaux (manioc) ou fruits (olives).

Tableau 3. Facteurs influant sur la maîtrise des bactéries lactiques (**Biavati et al., 2000**).

Facteurs influant sur la maîtrise des bactéries lactiques

Facteurs extrinsèques

- Les matières premières ne sont pas toujours de bons milieux de croissance :
 - Composition non optimum
 - Facteur inhibiteurs naturels
 - Traitement physique ou thermique
 - Conservation au froid
- Attaque de bactériophages
- Présence de résidus d'antibiotique

Facteurs intrinsèques

- Instabilité génétique
(plasmides codant pour des caractères technologiques)
- Lysogénie
- Interactions entre souches dans les levains constitués de plusieurs souches :
 - Compétitions métabolique
 - Production de bactériocines (peptides inhibiteur)

5.1.1 Les principales utilisations des bactéries lactiques en alimentation humaine

5.1.1.1 Produits laitiers

Les bactéries lactiques sont à la base de la fabrication des fromages, des yaourts, des laits fermentés et du kéfir.

Selon les types des fromages considérés, la coagulation du lait est obtenue par les actions conjuguées des enzymes coagulantes et des bactéries lactiques (*Lactocoques* essentiellement et/ou *Leuconostocs* pour les fromages à pâte molle ou à pâte pressée ; *Streptocoques*

thermophiles et *Lactobacilles thermophiles* pour les fromages à pâte pressée cuite). Le rôle principale de ces bactéries est l'abaissement du PH du lait ou des caillés, selon des cinétiques spécifique à chaque fabrication. Comme il a été décrit précédemment, la production d'acide lactique, responsable de la chute du PH, se fait aux dépens du lactose du lait et du caillé. Le caillé obtenu par l'action des enzymes protéolytiques de la présure restant à un PH proche de celui du lait (6.6 environ) n'est pas déminéralisé.

Il existe dans le monde une très grande variété de types de yaourt et de lait fermentés, obtenus à partir de lait de vache, mais aussi de lait de brebis, de chèvre, de jument, de bufflesse, d'ânesse ou de chamelle. On utilisera, selon les cas, soit les *Streptocoques thermophiles* et les *Lactobacilles thermophiles*, et les *Lactobacilles mésophiles*, soit ces bactéries lactiques associées à des levures (dans le cas du kéfir) ou des *Bifidobctéries*.

Le kéfir lacté fabriqué avec des grains stabilisés contient une microflore variée, car les bactéries lactiques mésophiles et thermophiles sont associées, dans la masse de polysaccharide du grain, avec des bactéries acétiques et des levures. Ce sont les lactobacilles hétérofermentaires (*Lb. brevis* et *L. kefir*) qui sont les plus représentés, mais les kéfirs contiennent aussi des lactobacilles homofermentaires thermophiles (*Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) ou mésophiles (*Lb. plantarum*, *Lb. casei*) et des leuconostocs. Parmi les levures fermentant le lactose, on retrouve essentiellement *Candida kefir* et *Kluyveromyces marxianus*, mais de nombreuses levures ne fermentant pas le lactose y prolifèrent. Le kéfir qui est le résultat d'une fermentation mixte lactique et alcoolique, est donc un lait fermenté acide, faiblement alcoolisé et gazeux. L'acétaldéhyde et le diacétyl participent aussi à son goût typique (Tailliez . 2004).

5.1.1.2 Produits carnés

Les saucisses fermentées semi-séchées se caractérisent par une fermentation souvent rapide, à des températures relativement élevées (21 à 46 °C) ; les PH finaux sont donc souvent inférieurs à 5,3. Au contraire, les saucisses fermentées séchées subissent une fermentation lente de plusieurs jours, à des températures relativement basses de 11 à 23 °C (phase d'étuvage), avant d'être séchées pendant plusieurs semaines à la chambre froide. Leur tenue en eau est basse. En prenant en exemple le saucisson sec français, on constate que les bactéries à Gram négatif disparaissent au cours de l'étuvage, les bactéries à Gram positif *Brocbothrix* et *Enterococcus* se multiplient pendant la phase d'étuvage, mais leur croissance s'arrête dès le début du séchage, alors que les Micrococcaceae se multiplient. Les lactobacilles ont quant à eux, un développement rapide. Au début de l'étuvage se développent *Carnobacterium divergens* et *Cb. Piscicola*. Ces espèces disparaissent en cours de maturation pour laisser la place à *Lactobacillus curvatus* et *Lb. sake* pour obtenir des produits de qualité constante, on utilise en Europe des ferments sélectionnés composés de souches de *Micrococcus*, *Staphylococcus* et *Lactobacillus* (Stiles & Holzappel, 1997).

5.1.1.3 Produits de pêche

La plupart de ces produits sont obtenus par des pratiques ancestrales empiriques, notamment en Asie où les bactéries lactiques n'interviennent pas seules mais associées à d'autres fermentations, à des hydrolyses enzymatiques, voire à des réactions purement chimiques.

Dans les pays scandinaves, le hareng est mis en tonneaux avec 15 à 17 % de sel, du sucre et des épices. On obtient les *gaffelbitar* ou *titbits*, *Lb. brevis* et *leuconostoc mesenteroides* (Axelsson, 2004).

5.1.1.4 Produits végétaux

La fermentation lactique des végétaux (choux, manioc, concombres, olives, betteraves rouges, carottes, navets, haricots verts, céleris, oignons, tomates vertes) est une technique largement utilisée dans les pays ne bénéficiant pas d'une structure industrielle, car elle peut être effectuée avec des moyens locaux très simples. Dans nombre de cas, au départ, après lavage de la matière primaire, les bactéries lactiques sont peu nombreuses. Elles appartiennent essentiellement aux espèces *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* et *Pediococcus damnosus*. L'addition de sel aux végétaux fait apparaître une phase liquide par plasmolyse celle-ci va réaliser une certaine anaérobiose et contenir les éléments solubles indispensables à une bonne croissance des ferments lactiques. Sous l'influence de l'acidité, *Lb. plantarum* arrête sa croissance en première, *Lb. brevis* continuant la fermentation en utilisant les sucres résiduels comme les pentoses (Cintas et al., 2001).

Tableau 4. Les principaux produits issus de la fermentation des bactéries lactiques (Penaud, 2006)

Genre	Substrat	Exemples de produits
<i>Bifidobacterium</i>	lait	laits fermentés
<i>Lactobacillus</i>	lait	yaourts, laits fermentés, kéfirs, fromages
	viande	saucissons secs, jambons secs
	végétaux	choucroute, olives, "yaourts" au lait de soja
	céréales	pain au levain, bières
<i>Lactococcus</i>	lait	fromages, kéfirs
<i>Leuconostoc</i>	Végétaux	choucroute, olives, vin
	lait	fromages, kéfirs
<i>Pediococcus</i>	végétaux	choucroute
	viande	saucisses semi-séchées
<i>Oenococcus</i>	végétaux	vin
<i>Streptococcus</i>	lait	yaourts, laits fermentés, fromages

5.1.2 Rôle des bactéries lactiques dans la conservation

5.1.3 Production d'acide lactique : Les bactéries lactiques ont un rôle important dans l'inhibition des flores non lactiques.

5.1.4 Production de bactériocines : Ces peptides antimicrobiens sont synthétisés par un très grand nombre de souches de bactéries lactique, elles sont généralement thermorésistantes.

5.2 Dans le domaine thérapeutique

L'intérêt des bactéries lactiques en matière de santé humaine a été initialement proposé au début du XX^{ème} siècle, en 1907 par le Russe Metchnikoff, selon lui les *Lactobacillus.sp* pouvaient réduire la putréfaction intestinale en modifiant sa flore. Le rôle des bactéries lactiques sur la santé était dans le cadre des probiotiques.

Les bienfaits des bactéries lactiques sont de plus en plus étudiés, certains sont bien établis d'autres restent encore contre versés (**Langella et al, 2001**).

L'extraordinaire diversité de structures des EPS en fait une classe de molécules dont les applications directes ou indirectes dans le domaine médical sont en plein essor. Le d'extranet et ses dérivés sont utilisés en laboratoire pour la purification de composés d'intérêt médical comme certaines enzymes, mais aussi comme outil thérapeutique en tant que « plasma artificiel ». Ils peuvent servir pour l'encapsulation de médicaments dans le but d'un relargage contrôlé ou en exploitation des propriétés biologiques de ces polymères.

La préparation de vaccins à partir d'EPS évite l'utilisation d'extrait cellulaires et donc les effets secondaires provoqués par les métabolites tels que les lipopolysaccharides et les protéines (**Benasla, 2012**).

Tableau 5. Utilisation des bactéries lactiques dans la fermentation alimentaire et exemples des espèces prédominantes (McKay et Baldwin, 1990).

Applications	Espèces utilisées
Fermentations des végétaux	<i>Ln. mesenteroides</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Lb. plantarum</i>
Fermentations de viandes et poissons	<i>Lb. plantarum</i> , <i>P. acidilactici</i>
Boissons alcoolisées	<i>Oenococcus oeni</i> , <i>Lb. delbruekii</i>
Café et cacao	Bactéries lactiques variées
Sauce de Soja	<i>Lb. delbruekii</i> , <i>P. soyae</i>
Aliments fermentés indigènes	Bactéries lactiques variées
Ensilage	<i>Lb. plantarum</i>
Probiotiques	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. casei</i>
Pain au levain	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>Lb. fermentum</i>
Biscuits	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. leichmannii</i> , <i>Lb. casei</i>
Produits laitiers fermentés	<i>Lc. lactis subsp lactis</i> , <i>Lc. lactis subsp cremoris</i> , <i>Lc. lactis subsp latis biovar diacetylactis</i> , <i>Ln. mesenteroides subsp cremoris</i> , <i>Ln. lactis</i> , <i>St. thermophilus</i> , <i>Lb. delbruekii subsp. bulgaricus</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. acidophilus</i>

6 Les bactéries lactiques comme probiotiques

6.1 Définition des probiotiques

Le terme probiotique dérive de deux mots grec « pros » et « bios » qui signifient littéralement « pour la vie » par opposition aux antibiotiques qui signifie « contre la vie » (Guarner et al., 2005). Plus récemment et selon la définition adoptée par le groupe de travail mixte formé par l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'organisation mondiale de la santé (OMS) en 2002, les probiotiques sont « des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte qui les ingère » (FAO/WHO, 2002). Ces microorganismes généralement sont des bactéries qui influencent la santé humaine et animale et protègent de certaines infections intestinales, participent au premier lieu à la digestion et influencent le système immunitaire (Malíková et al., 2020 ; Zheng et al., 2017).

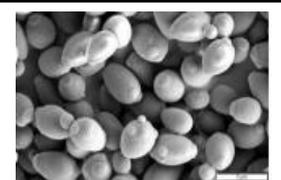
6.2 Microorganismes probiotiques

Les principaux microorganismes probiotiques qui sont utilisés appartiennent principalement aux genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Enterococcus* (Rayavarapu et Tallapragada, 2019).

Bien que d'autres espèces des genres *Escherichia coli*, *Bacillus* (bactéries non lactiques) et également des levures telles que *Saccharomyces* ont fait l'objet d'applications sur le marché

du probiotique (Doron et Snyderman, 2015). Toutefois, des interrogations subsistent en ce qui concerne l'utilisation sans danger de ces microorganismes non lactiques (Eaton et Gasson, 2001 ; Ishibashi et Yamazaki, 2001) (Tableau 6).

Tableau 6. Principales espèces microbiennes comme probiotiques (Fijan, 2014 ; Khalighi et al., 2016 ; Varankovich et al., 2015).

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Autres bactéries lactiques	Bactéries non-lactiques
			
<ul style="list-style-type: none"> - <i>L. acidophilus</i> - <i>L. amylovorus</i> - <i>L. brevis</i> - <i>L. casei</i> - <i>L. cellobius</i> - <i>L. crispatus</i> - <i>L. curvatus</i> - <i>L. delbrueckii</i> - <i>L. farciminis</i> - <i>L. fermentum</i> - <i>L. gallinarum</i> - <i>L. gasseri</i> - <i>L. johnsonii</i> - <i>L. paracasei</i> - <i>L. plantarum</i> - <i>L. reuteri</i> - <i>L. rhamnosus</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>B. adolescentis</i> - <i>B. animalis</i> - <i>B. bifidum</i> - <i>B. breve</i> - <i>B. infantis</i> - <i>B. lactis</i> - <i>B. longum</i> - <i>B. thermophilum</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Enterococcus faecalis</i> - <i>Enterococcus faecium</i> - <i>Lactococcus lactis</i> - <i>Leuconostoc mesenteroides</i> - <i>Pediococcus acidilactici</i> - <i>Sporolactobacillus inulinus</i> - <i>Streptococcus thermophilus</i> - <i>Streptococcus diacetylactis</i> - <i>Streptococcus intermedius</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Bacillus spp.</i> - <i>Escherichia coli</i> - <i>Nissle</i> - <i>Propionibacterium freudenreichii</i> - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> - <i>Saccharomyces boulardii</i>

6.3 Les probiotiques et leurs effets bénéfiques sur la santé

Différents effets positifs sont ainsi attribués aux probiotiques. Cependant, des études doivent encore être réalisées afin de confirmer certains bienfaits. Ces effets sont décrits dans le tableau 7 et expliqués ci-dessous. Il est à noter que la validité scientifique de ces effets bénéfiques est très variable. Pour certains effets, des preuves scientifiques irréfutables appuyées par des études cliniques existent et permettent d'attribuer certaines allégations-santé aux produits probiotiques (Moroni, 2007).

Tableau 7. Effets positifs des probiotiques sur la santé (effets probables ou suspectés) (Moroni,2007).

Evidences scientifiques fortes	
Effets des probiotiques	Mécanismes des probiotiques
Aide à la digestion du lactose	<ul style="list-style-type: none"> • Action de la β- galactosidase bactérienne
Réduction du risque des diarrhées	<ul style="list-style-type: none"> • Activité antipathogène • Stimulation du système immunitaire
Diminution des allergies alimentaires	<ul style="list-style-type: none"> • Amélioration de la fonction barrière de la muqueuse • Stimulation du système immunitaire • Dégradation des protéines allergènes
Evidences scientifiques prometteuses	
Effets des probiotiques	Mécanismes des probiotiques
Activité hypocholestérolémiante	<ul style="list-style-type: none"> • Assimilation du cholestérol • Déconjugaison des sels biliaires
prévention du cancer du côlon	<ul style="list-style-type: none"> • Production de composés antimutagéniques • Modulation des enzymes fécales carcinogéniques • Stimulation du système immunitaire
Résistance contre les maladies inflammatoires et irritables des intestins	<ul style="list-style-type: none"> • Activité antipathogène • Stimulation du système immunitaire
Diminution des infections à <i>Helicobacter pylori</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Activité antipathogène
Effet antihypertenseur	<ul style="list-style-type: none"> • Action des peptidases sur les protéines du lait donnant des peptides bioactifs

7 Les facteurs inhibiteurs produits par les bactéries lactiques (facteurs antimicrobiens des bactéries lactiques)

Parmi les principaux atouts des bactéries lactiques est la préservation des qualités nutritionnelles et organoleptiques des produits alimentaires et l'augmentation de la durée de conservation.

En effet, les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes classé en deux catégories : composée a petite masse moléculaire (LMM= low molécular compound) tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, diacétyl, le dioxyde de carbone, et des composées a grand masse moléculaire (HMM : high masse molécular compound) tel que les bactériocines (ammor et al., 2006).

7.1 Les acides organiques

Les acides organiques sont produits par les bactéries lactiques au cours de processus de fermentation alimentaires.

La fermentation par les BL est caractérisée par l'accumulation d'acides organiques qui s'accompagne d'une réduction du pH (**Podolak et al., 1996**)

Leur effets antimicrobiens sont bien connus à l'heure actuelle. Ces acides, sous leur forme dissociée ou non dissocié, agissent au niveau de la membrane et en inhibant les systèmes membranaires de transport actif. 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 (**Annan Prah & Agyeman, 1997**).

7.2 Le peroxyde d'hydrogène

Les bactéries lactiques sont dépourvues de catalases catalysant la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et en oxygène. 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**).

7.3 Le dioxyde de carbone

Les bactéries lactiques hétérofermentaire synthétisent du dioxyde de carbone (CO₂) Comme métabolite secondaire. Son accumulation dans le milieu extérieur crée une anaérobiose qui peut être toxique pour les microorganismes aérobies présents dans l'aliment. Toutefois, le dioxyde de carbone peut aussi, à faible concentration, stimuler la croissance de certaines bactéries (**Dobrogosz, 1990**).

7.4 Le diacétyl

Il est synthétisé par différents genres de bactéries lactiques comme *Lactococcus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Lactobacillus sp.* et *Pediococcus sp.* Le diacétyl (C₄H₆O₂) est un des composants aromatiques essentiels du beurre. Il 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**).

7.5 La reutérine

La reutérine (ou 3-hydroxypropionaldehyde) est une substance antimicrobienne qui est produite comme métabolite intermédiaire pendant la fermentation anaérobie du glycérol par certaines espèces de *Lactobacillus* ainsi que par d'autres genres bactériens non lactiques tels que *Bacillus*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Clostridium* (**El-Ziney et al., 1998**). Elle a un large spectre d'activité. Elle a une action contre les bactéries (Gram-positif ou Gram-négatif), les champignons et les protozoaires. Elle interfère avec la réplication de l'ADN. Elle a des applications aussi bien dans le domaine médical que dans le domaine alimentaire (**Vollenweider, 2000**).

7.6 Les bactériocines

Certains ferments sont capables de produire des bactériocines ; ces molécules sont particulièrement intéressantes pour l'élaboration de produits à partir de lait cru donc susceptibles de contenir des micro-organismes indésirables voire pathogènes.

Les consommateurs sont directement concernés par la présence d'additifs chimiques dans leurs aliments. En conséquence, ils sont attirés par des produits alimentaires frais et sans ajout d'agents de conservation chimiques. Les bactériocines produites par les bactéries lactiques, peuvent être considéré comme des conservateurs naturels ou biopréservateurs qui accomplissent ces exigences. La conservation bio fait référence à l'usage de microorganismes antagonistes ou leurs produits métaboliques inhibent ou détruisent des microorganismes indésirables dans les aliments, afin d'augmenter la sécurité alimentaire et prolonger la durée de vie de conservation (Schillinger et al., 1996).

8 Propriétés technologiques des bactéries lactiques

8.1 Aptitude acidifiante

La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées dans les industries alimentaires. Elle se manifeste par la production de l'acide lactique à partir de la fermentation des hydrates de carbone au cours de la croissance bactérienne (Monnet et al., 2008). Les conséquences, d'ordre physico-chimique et microbiologique, peuvent se résumer ainsi par (Béal et al., 2008) :

- Accumulation d'acide lactique participant à la saveur des aliments fermentés
- Abaissement progressif du pH des milieux de culture et des matrices alimentaires
- Limitation des risques de développement des flores pathogène et d'altération dans les produits finaux
- Déstabilisation des micelles de caséines, coagulation des laits et participation à la synérèse.

Pour un ferment donné, il s'agit de permettre une vitesse d'acidification élevée et/ou d'atteindre un niveau d'acidité finale prédéfinie. Le niveau d'acidité dépend des spécifications du produit, lesquelles vont conditionner le choix des souches (Monnet et al., 2008).

8.2 Aptitude texturante

La capacité des bactéries lactiques à synthétiser des exo-polysaccharides (EPS) joue un rôle important pour la consistance et la rhéologie des produits transformés. Les *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* produisant des EPS sont utilisés dans la fabrication des yaourts, ceci afin d'améliorer la texture, éviter la synérèse et augmenter la viscosité des produits finis. L'utilisation des EPS produits par les souches *Lc. lactis ssp. crémoirs* est très prometteuse pour la structure et la viscosité des produits laitiers fermentés.

8.3 Aptitude aromatisante

Les bactéries lactiques sont capables de produire de nombreux composés aromatiques (tels que : l'a-acétolactate, l'acétaldéhyde, le diacétyle, l'acétoïne et 2,3-butanediol, l'éthanol, l'acétate, le formiate, ...etc.) principalement à partir du lactose, du citrate, des acides aminés et des matières grasses. Cette fonctionnalité est particulièrement importante lors de l'élaboration des laits fermentés, des fromages frais, crèmes et beurre, dont l'arôme principal est lié à cette activité microbienne (Bourgeois & Larpent, 1996).

8.4 Activité antimicrobienne

Les bactéries lactiques produisent une variété de composés antimicrobiens qui sont utilisés dans la fermentation et la bio-conservation des aliments. Les acides organiques, comme l'acide lactique, l'acide acétique ou l'acide propionique, élaborés lors de la fermentation des glucides, peuvent inhiber des levures, des moisissures et des bactéries. Le peroxyde d'hydrogène produit par les bactéries lactiques s'accumule dans l'environnement et peut inhiber certains microorganismes. Les bactéries lactiques hétérofermentaires synthétisent du dioxyde de carbone comme métabolite secondaire. Son accumulation dans le milieu extérieur crée une anaérobiose qui s'avère toxique pour certains microorganismes aérobies présents dans l'aliment.

Le diacétyl peut inhiber la croissance des bactéries à Gram négatif, des levures et moisissures (**Alakomi et al., 2000**).

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont des substances antimicrobiennes de poids moléculaire variable. Elles ont une activité inhibitrice dirigée contre les bactéries proches de la souche productrice et leur spectre d'action est généralement étroit. Les plus connues sont : la nisine, la diplococcine, l'acidophiline et la bulgaricane (**Ogunbanwo et al., 2003**).

La plupart des bactériocines produites par les bactéries lactiques partagent le même mode d'action, basé sur la formation de pores dans la membrane de la bactérie cible (**De Vuyst & Leroy, 2007**).

CHAPITRE II. LES BACTERIOCINES

1. Généralités

Klaenhammer (1988), suggère que 99% des bactéries peuvent produire au moins une bactériocine. Pour des raisons de sécurité alimentaire, plusieurs bactéries n'ont pas fait l'objet d'études, pour la production de bactériocines. Les bactériocines des bactéries lactiques sont les plus abordées dans la recherche. Ces substances protéiques, sont des toxines à spectre d'action plus ou moins large (**Riley & Wertz, 2002**). Ces molécules constituent la deuxième cause de l'effet inhibiteur des bactéries lactiques, après celle causée par les acides organiques.

Le terme «**bactériocine**» est employé pour la première fois par **Jacob et al, (1953)** pour les peptides à spécificité importante, produits par certaines souches et actifs contre les souches de la même espèce. La première bactériocine, nommé la colicine était produite par *Escherichia coli* S (**Gratia, 1925**). Depuis, l'étude des bactériocines s'est élargie. **Rogers et Whitter (1928)**, furent les premiers à étudier les inhibiteurs des bactéries lactiques, et plus spécialement des *lactocoques*.

Le chapitre suivant est consacré aux bactériocines des bactéries lactiques, à leur classification, leur biosynthèse et sa régulation, l'immunité des bactéries productrices, leur mode d'action, d'une part. Et d'autre part leur application dans différents domaines.

2. Bactériocines

Différentes définitions des bactériocines ont été données au cours du temps. Cependant, la définition qui reste la plus largement acceptée est celle de **Klaenhammer (1988)** qui définit les bactériocines comme des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice.

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**). Toutes les bactériocines produites par des bactéries lactiques décrites jusqu'à présent ont une activité dirigée contre les bactéries Gram+. Aucune bactériocine produite par des bactéries lactiques avec une activité contre des bactéries Gram- n'a été décrite, la membrane externe des bactéries Gram- ne permettant pas aux bactériocines d'atteindre la membrane interne, siège de leur activité (**Gratia, 1925**).

3. Biologie des bactériocines

Les bactériocines peuvent être définies comme de petits peptides thermostables produits par des bactéries qui sont actifs contre d'autres bactéries et contre lesquels le producteur a un mécanisme d'immunité spécifique. Les bactériocines qui auront probablement le potentiel le plus immédiat dans les applications alimentaires seront celles produites par les bactéries lactiques de qualité alimentaire, car elles sont plus susceptibles d'obtenir l'approbation

réglementaire en raison de leur origine, et elles peuvent être facilement introduites dans les aliments fermentés sans toute concentration ou purification. Les bactériocines produites par les bactéries lactiques peuvent être à spectre large ou étroit, mais en général, l'activité est dirigée contre les espèces Gram-positives à faible GC. Une activité contre les bactéries Gram-négatives a été démontrée, mais généralement uniquement dans des situations où l'intégrité de la membrane externe a été compromise.

Les bactériocines sont un groupe hétérogène de peptides et de protéines et jusqu'à cinq classes principales de bactériocines LAB ont été évoquées. Les bactériocines sont divisées en deux catégories distinctes : les bactériocines contenant de la lanthionine LANTIBIOTICS (classe I) et les bactériocines ne contenant pas de lanthionine (classe II), tout en déplaçant les grandes hydrolases murines thermolabiles (anciennement bactériocines de classe III) vers une désignation distincte appelée 'BACTÉRIOLYSINES'. Il a été récemment proposé que les bactériocines circulaires soient considérées comme des bactériocines de classe VI. Nous suggérons de les inclure dans la catégorie de classe II ne contenant pas de lanthionine. La classe IV était une classification réservée aux bactériocines qui nécessitent des fragments non protéiniques pour leur activité, mais aucun membre de cette classe n'a encore été démontré de manière convaincante, et nous n'avons donc pas inclus cette classe dans la nouvelle proposition (Finland et al., 2000).

4. Classification des bactériocines

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont réparties en quatre classes, comme proposé par Klaenhammer (1993). Ces quatre classes sont :

4.1. 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.

Cette classe est subdivisée en deux types, selon leur structure et leur mode d'action :

4.1.1. Le type A linear

Regroupe les lantibiotiques linéaires, avec une charge nettement positive, leur mode d'action se manifeste par la formation de pores sur la membrane de l'hôte.

4.1.2. Le type B globulaires

Constitue les lantibiotiques globulaires, possédant une charge négative, ou ne contenant pas de charge, elles attaquent des enzymes spécifiques et les inhibent (Mc Auliffe et al., 2001).

La nisine, est une bactériocine du type A des lantibiotiques, un peptide de 34 acides aminés, de poids moléculaire de 3,5 kDa et thermorésistante. Découverte par hasard en 1928, elle a été appelée "une substance inhibitrice du Groupe N (streptococci)" en 1947. Sa structure a été élucidée en 1971. Elle est active à des pH bas. En 1983, la nisine est ajoutée dans la liste des additifs alimentaires (E234), elle est reconnue comme GRAS par FDA (Food and Drug Administration). Elle est produite par des souches de *Lactococcus lactis* subsp *lactis*. Depuis,

d'autres variantes (A, Z, Q, U et U2) ont été isolées (Lubelski *et al.*, 2008). chaque type se trouvent à la **Figure 4**.

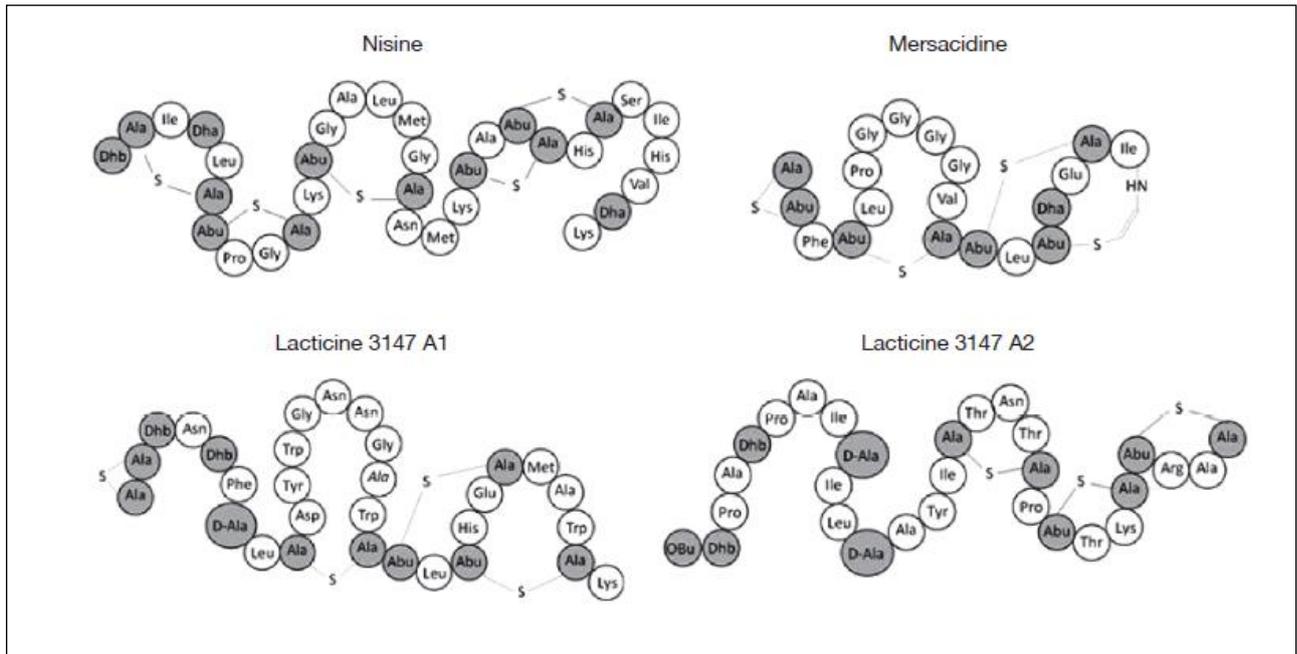


Figure 3. Séquence et structure de lantibiotiques de type A (Nisine), B (Mersacidine) et d'un lantibiotique « two-peptides » (Lacticine 3147 A1 et A2) — *Sequence and structure of a type A lantibiotic (Nisin), a type B lantibiotic (Mersacidin) and a « two-peptides » lantibiotic (Lacticin 3147 A1 and A2).*

4.1.3. Lantibiotiques de type C multi-composants

Chacun des consortiums de lantibiotiques à plusieurs composants décrits à ce jour comprend deux peptides modifiés post-traditionnellement qui ont individuellement peu ou pas d'activité, mais présentent une forte action antibactérienne synergique. Lacticine 3147 produite par *Lactococcus lactis* DPC3147 est sans doute le membre le plus étudié de ce groupe, et les deux peptides composants (LtnA1 et LtnA2) ont été structurellement caractérisés. Les caractéristiques des peptides comprennent les résidus Lan et MeLan, ainsi qu'un RÉ- Ala résidu dérivé de L- Ser par modification post-traductionnelle. Fait intéressant, la structure de LtnA1 ressemble quelque peu à celle de la mersacidine lantibiotique de type B, et le peptide LtnA2 présente une certaine similitude avec la lactocine S (un lantibiotique de type AII). Les différences structurelles évidentes entre LtnA1 et LtnA2 nécessitent donc que le locus génétique de la lacticine 3147 code pour deux enzymes LanM, dont chacune est vraisemblablement responsable de la modification post traductionnelle de l'un des peptides . Il a récemment été montré que le mécanisme d'action de la lacticine 3147 résulte de l'action séquentielle des deux peptides, à condition que LtnA1 soit ajouté avant LtnA2 . Il a donc été déduit que LtnA1 se lie au lipide II (une réaction responsable de l'activité inhibitrice indépendante affichée par LtnA1).

4.2. Classe II peptidiques

Peptides de taille inférieure à 10 kDa, stables à la chaleur, ne contenant pas d'acides aminés modifiés. Leur point isoélectrique varie entre 8 et 10. Les séquences de quelques bactériocines appartenant à cette classe se trouvent au **Tableau 1**. Cette classe est divisée en trois sous-classes.

4.2.1. La Sous classe *Ia* peptides anti-listériens ayant le motif d'acides aminés YGNGV/L dans la partie N-terminale du peptide (type pédiocine)

contiennent entre 27 et 48 acides aminés et ont toutes une partie N-terminale hydrophobe contenant la séquence consensus YGNGV ainsi qu'un pont disulfure et une partie C-terminale moins conservée, hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action (**Fimland et al., 2000**). Elles ont toutes une activité contre *Listeria monocytogenes*. Certaines bactériocines de cette sous-classe contiennent également un deuxième pont disulfure dans leur domaine C-terminale qui semble être important dans la stabilisation de la structure tertiaire.

4.2.2. La Sous classe *Ib* peptides à deux composants

Regroupe les bactériocines contenant deux peptides, l'activité de ces peptides permet de distinguer deux types :

le type E (Enhancing), où un des deux peptides sert à stimuler l'activité de l'autre peptide et **le type S (Synergy)** où les activités des deux peptides sont complémentaires. La lactacine F produite par *Lactobacillus johnsonii* est une bactériocine de la sous classe *Ib*.

4.2.3. La Sous classe *Ic* peptides activés par les thiols nécessitant des résidus de cystéine réduits pour l'activité

Elle contient d'autres bactériocines qui ne peuvent pas être classées dans les sous classes *Ia* et *Ib*. L'acidocine B est une bactériocine de cette sous classe, produite par *Lactobacillus acidophilus*.

4.3. Classe III protéiques

Protéines de taille supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur. La structure et le mode d'action de ces bactériocines diffèrent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques. Cette classe ne contient que quatre bactériocines :

l'helveticin J produite par *Lactobacillus helveticus* A, l'enterolysin A produite par *Enterococcus faecium*, la zoocin A produite par *Spreptococcus zooepidemicus* et la millericin B produite par *Streptococcus milleri*.

4.3.1. Type IIIa : les bactériolysines (enzymes bactériolytiques)

4.3.1.1. *Lysostaphine* – Le prototype de bactériolysine Initialement décrite il y a plus de 40 ans (Schindler &Schuhardt .1964), la lysostaphine (produite par *Staphylococcus simulans* biovar staphylolytique). La lysostaphine est une glycyglycine endopeptidase codée par un plasmide qui tue les cellules sensibles en hydrolysant spécifiquement les ponts croisés de la pentaglycine dans le peptidoglycane (Robinson et al., 1979).

4.3.1.2. *Zoocine A et autres bactériolysines*

Au cours des 10 dernières années, de nombreux progrès ont également été réalisés dans la caractérisation des bactériolysines produites par les bactéries lactiques, principalement des membres des genres *Streptocoque* et *Entérocoque*. L'enzyme bactériolytique *streptococcique* prototype est la zoocine A, qui est spécifiée par un gène localisé dans les chromosomes (*zooA*) dans *Streptocoque equi subsp.*

4.3.2. Type IIIb : les bactériocines non lytiques En tant qu'antithèse des bactériolysines, il a été démontré que plusieurs grandes bactériocines tuent les cellules cibles par des moyens non lytiques. Cela pourrait impliquer la dissipation de la force motrice du proton, conduisant à une privation d'ATP et finalement à la mort cellulaire.

Tableau 8. Quelques bactériocines distinctives de classe II et leur caractéristique (Mc Auliffe et al., 2001) .

Bactériocine	Espèce productrice	Caractéristiques distinctives
Type IIa : peptides de type pédiocine		
Pédiocine PA1	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Prototype de bactériocine antilistérielle ; le locus biosynthétique est d'origine plasmidique; contient le motif YGNGV qui caractérise cette famille de bactériocines ; le mode d'action et le mécanisme d'immunité sont bien définis; première bactériocine à être exportée par un transporteur ABC avec clivage concomitant d'un peptide signal immédiatement après un motif de séquence double glycine (GG)
Carnobactériocine B2	<i>Carnobactérie piscicola</i>	Première bactériocine de type pédiocine exportée via un système de transport Sec-dépendant
Listeriocine 743A	<i>Listeria innocua</i> Première	bactériocine décrite pour <i>Listeria</i> spp.; affiche les caractéristiques typiques des peptides de type pédiocine et est exporté via la voie Sec-dépendante
Ubéricine A	<i>Streptococcus uberis</i>	Premier agent inhibiteur streptococcique de type pédiocine à caractériser ; locus de biosynthèse codé par les chromosomes
Type IIb : inhibiteurs multi-composants		
Lactococcine G	<i>Lactococcus lactis</i>	Première bactériocine de classe II à deux composants et de type S (synergique) à être caractérisée
Thermophiline 13	<i>Streptocoque thermophile</i>	Bactériocine à deux composants de type prototype E (amplificateur); ThmA* est le peptide inhibiteur principal et ThmB* (aucune activité intrinsèque propre), lorsqu'il est ajouté, améliore l'activité inhibitrice ; mécanisme d'exportation inconnu, bien que le motif GG soit présent dans les séquences de tête putatives des peptides précurseurs

Tableau 8. Quelques bactériocines distinctives de classeII et leur caractéristique (Mc Auliffe et al., 2001) (suite).

Bactériocine	Caractéristiques distinctives	Espèce productrice
Entéroicine L50	<i>Enterococcus faecium</i>	Un système de bactériocine de type E dans lequel les peptides composants sont sécrétés sans peptides signal N-terminaux reconnaissables
Streptocines STH 1 et STH 2	<i>Streptocoque gordonii</i>	Un nouveau système bactériocine/hémolysine à deux composants dont la biosynthèse dépend du développement d'une compétence naturelle pour la transformation génétique ; l'expression des gènes de structure semble être activée par le facteur sigma spécifique à la compétence, et les prépeptides sont traités et exportés via le même système de transport requis pour la sécrétion de la peptide stimulant la compétence
Plantaricine NC8	<i>Lactobacilles plantaire</i>	Bactériocine à deux composants dont la biogenèse est activée par un système de transduction de signaux à trois composants qui semble être sensible au contact interspécifique de cellule à cellule
Peptides SLUSH	<i>Staphylocoque lugdunensis</i>	Un système putatif bactériocine/hémolysine à trois composants ; les peptides individuels n'ont pas été purifiés
Auréocine A70	<i>Staphylococcus aureus</i>	Une bactériocine putative de type E à quatre composants, mais l'activité inhibitrice ne peut être démontrée qu'avec trois peptides composants individuels ; chaque peptide composant semble être sécrété sans peptide signal
Plantaricine C11	<i>Kg. plantaire</i>	Un système de bactériocine à plusieurs composants codé par deux opérons ; la régulation génétique du locus de la bactériocine est unique, en ce sens que deux régulateurs transcriptionnels avec des fonctions antagonistes semblent fonctionner, favorisant un ajustement temporel et spatial dépendant de l'environnement

4.4. Classe IV complexes

Ces agents inhibiteurs circulaires sont des peptides synthétisés par le ribosome, qui sont traités après la traduction de manière à ce que les premier et dernier acides aminés du peptide mature soient liés de manière covalente, ce qui correspond à la ligature dite tête-à-queue (Maqueda et al., 2004). À ce jour, cette classe ne comprend qu'une poignée de membres, le prototype étant l'entéroisine AS-48 (largement revue par Maqueda et al., 2004).

4.4.1. Entéroisine AS-48 Il y a plus de 20 ans, un nouvel agent inhibiteur thermostable (appelé entéroisine AS-48) produit par *E. faecalis subsp. liquefaciens* la souche S-48 a été décrite pour la première fois (Galvez et al., 1985), l'AS-48 et ses variantes naturelles sont également connues sous d'autres noms tels que l'entéroisine 4 et la bactériocine 21 (Maqueda et al., 2004). La nature cyclique de l'AS-48 a provoqué l'échec des tentatives initiales d'obtention de la séquence d'acides aminés du peptide, car l'extrémité Nterminale est essentiellement bloquée. Cette limitation a finalement été surmontée par une digestion endopeptidase suivie d'un séquençage N-terminal des fragments internes. L'AS-48 est depuis devenue l'une des bactériocines les plus largement caractérisées en termes de biochimie.

4.4.2. Gasséricine A et Reutéricine 6 La gasséricine A et la reutéricine 6 sont des peptides cycliques produits par *Lactobacillus gasseri* et *Lactobacillus reuteri*, respectivement, qui possèdent des séquences d'acides aminés primaires identiques déduites de leurs gènes de structure (Kawai et al., 2004).

4.4.3. Uberolysine *S. uberis*, l'un des agents responsables de la mammite bovine, est un producteur prolifique de bactériocines. Les souches individuelles produisent différentes combinaisons de diverses classes de bactériocines, y compris le lantibiotique nisine U (Sect. 4.2.1), l'ubéricine A de type pédiocine (Sect. 4.3.1), et une nouvelle bactériocine circulaire appelée ubérolysine (RE Wirawan et al., soumis).

Tableau 9. La classification de quelques bactériocines des bactéries lactiques (**Chen & Hoover, 2003**).

Bactériocine	Caractéristiques distinctives	Espèce productrice
Entéroïcine	<i>AS-48 Enterococcus faecalis</i>	Bactériocine circulaire prototype et la mieux caractérisée, à la fois biochimiquement et génétiquement
gasséricine	<i>A Lactobacillus gasseri</i>	La première bactériocine cyclique à être signalée qui contient un mélange de RÉ- et L- acides aminés (au moins RÉ- Ala)
Reutéricine 6	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Séquence d'acides aminés primaire identique à la gasséricine A mais spectre inhibiteur différent en raison de la composition altérée de RÉ- alanine
Circularine A	<i>Clostridium beijerinckii</i>	Bactériocine cyclique bien caractérisée avec un traitement post- traductionnel inhabituel ; locus génétique (cir) contient des gènes homologues à ceux trouvés dans le locus AS-48
Butyrvibriocine A	<i>Butyrvibrio fibrisolvens</i>	La première bactériocine cyclique identifiée à partir d'une bactérie du rumen ; similaire à la gasséricine A
Uberolysine	<i>Streptococcus uberis</i>	Première bactériocine cyclique à être caractérisée (biochimiquement et génétiquement) du genre Streptocoque; inhabituel en raison de sa thermolabilité et de la lyse des cellules en croissance active

La classification la plus récente, est proposée par **Heng et Tagg, (2006)**, elle regroupe quatre classes :

- ✚ Classe I : pour les lantibiotiques
- ✚ Classe II : peptides non modifiés
- ✚ Classe III : protéines
- ✚ Classe IV pour les peptides cycliques.

La classification des bactériocines permet d'établir une relation entre la fonction et la structure de ces molécules, pour une application possible. Le mode d'action de la plupart des bactériocines se manifeste par l'adsorption à la membrane de l'hôte et la formation des pores, ce qui provoque la mort cellulaire (**Bauer & Dicks, 2005**).

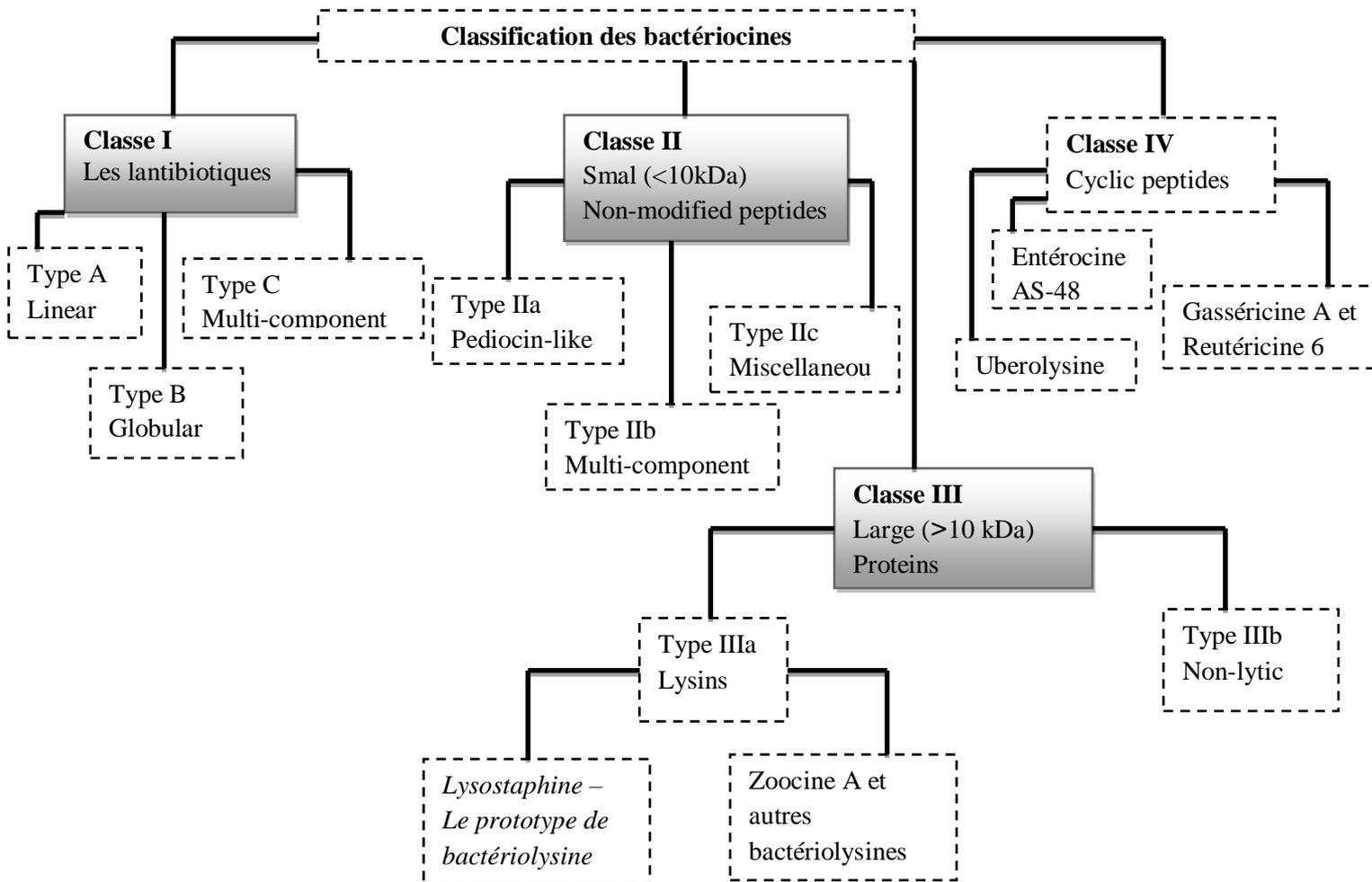


Figure 4. Notre schéma de classification proposé basé sur celui de **Cotter et al. (2005b)** d'une manière à être applicable à la plupart.

Tableau 10. La classification de quelques bactériocines des bactéries lactiques (Chen & Hoover, 2003).

bactériocine	souche productrice	Références
Classe I- lantibiotique type A		
nisine	<i>Lactococcus lactis</i>	Hurst, (1981)
lactocine S	<i>Lactobacillus sake</i>	Mortvedt et al, (1991)
Classe I- lantibiotiques type B		
cinnamycine	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>	Sahl et Bierbaum, (1998)
ancovenine	<i>Streptomyces sp.</i>	
Classe IIa		
pediocine PA-1/AcH	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Henderson et al. (1992); Motlagh et al. (1992)
lactococcine MMFII	<i>Lactococcus lactis</i>	Ferchichi et al. (2001)
Classe IIb		
lactococcine G	<i>Lactococcus lactis</i>	Nissen-Meyer et al.(1992)
plantaricine EF	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Anderssen et al. (1998)
Classe IIc		
acidocine B	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Leer et al. (1995)
Classe III		
helveticine J	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Joerger et Klaenhammer, (1986)
helveticin V-1829	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Vaughan et al. (1992)

5. Biosynthèse et régulation de la production des bactériocines

Le mécanisme de biosynthèse des bactériocines et sa régulation fait appel à un système complexe, en effet, la biosynthèse dépend d'un ensemble de gènes de structure, qui codent pour le peptide et son transport ainsi que l'immunité de la bactérie productrice. Cet Opéron transcrit un prépeptide (non actif), qui sera actif en milieu extracellulaire ; la cellule doit s'immuniser contre sa propre bactériocine.

La production des bactériocines de classe I et II est détaillée ci-dessous :

5.1. La biosynthèse des lantibiotiques

La nisine est le lantibiotique la plus caractérisé et étudié. En général, la biosynthèse de la nisine, comme celle des autres bactériocines de cette classe, se déroule en trois étapes (**Figure 5**) :

- La formation des acides aminés inhabituels (les modifications post traductionnelles)
- L'organisation en structure cyclique de la pré-nisine.

- Le clivage et le transport vers l'extérieur. Ces derniers sont assurés par le système de transport (le transporteur ABC dépendant).

Le gène de structure est appelé Nis, il code pour un prépeptide de 23 à 30 acides aminés, qui sera clivé à l'extérieur de la cellule. Mais avant, il subira des modifications post-traductionnelles : les serines et les thréonines seront déshydratés par une déshydratase, formant ainsi des acides aminés inhabituels (déhydroalanines et déhydrobutyrines). Ces derniers établiront une structure cyclique, par des ponts thioéther, avec les cystéines proches, à l'aide d'une cyclase codée par les gènes NisB et NisC ou le gène NisM.

Le transport du prépeptide est assuré par le gène de structure, qui sera clivé par une protéase NisP ou par le domaine protéasique (**Figure 5**) du système transporteur ABC, le NisT (**Mc Auliffe et al., 2001**).

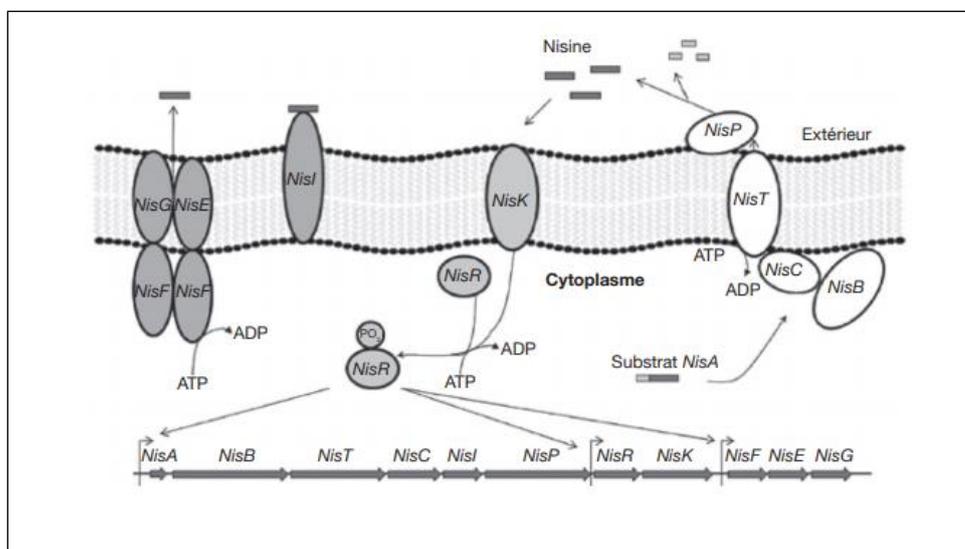


Figure 5.Régulation de la production, modifications post-traductionnelles et auto-immunité de la nisine (**Mc Auliffe et al., 2001**).

Le substrat NisA est le prépeptide non biologiquement actif qui sera déshydraté par NisB et cyclisé par NisC avant sa translocation par le transporteur ABC NisT et le clivage de la séquence signal par la protéase NisP. Ces modifications conduiront au peptide biologiquement actif. La nisine interagira avec l'histidine kinase NisK, ce qui induira la phosphorylation du régulateur de réponse NisR et l'activation de la transcription des gènes nécessaires à la production de la nisine. La protection de la cellule bactérienne vis-à-vis de la nisine est réalisée par deux mécanismes : la lipoprotéine d'immunité NisI et l'ABC transporteur formé par NisG, NisE et NisF (**Patton et al., 2005**).

NisA : prépeptide **NisB** : déshydratase **NisC** : cyclase **NisT** : l'ABC transporteur
NisP : la protéase **NisK** : l'histidine kinase **NisR** : le régulateur de réponse
NisI : la lipoprotéine d'immunité **NisG, NisE et NisF** : l'ABC transporteur.

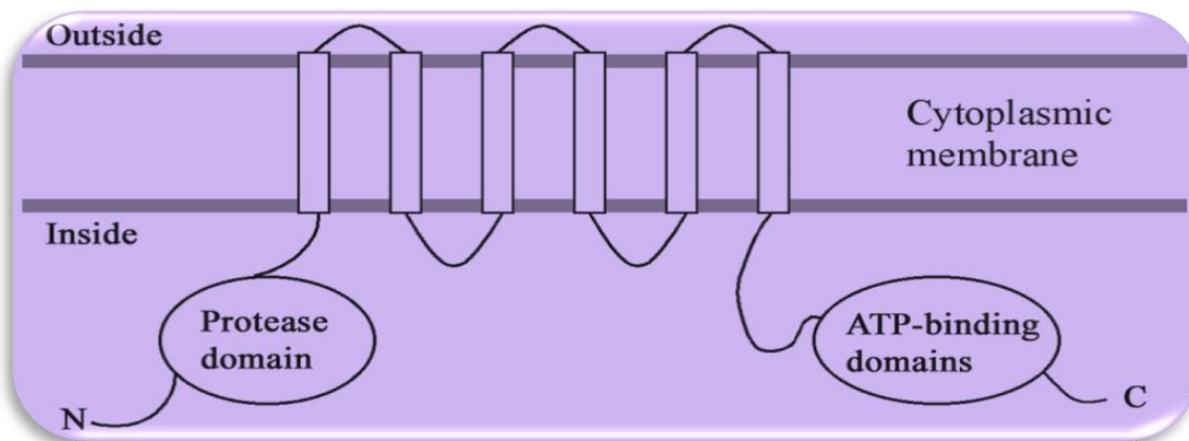


Figure 6. ABC-transporteur avec le domaine protéasique, (Patton *et al.*, 2005) .

5.2. Biosynthèse des bactériocines de classe II

Les bactériocines de cette classe, sont synthétisées sous forme d'un prépeptide, ce prépeptide ne contient pas des acides aminés inhabituels, il n'est pas biologiquement actif. Il sera transporté à l'extérieur après le clivage de son peptide leader et la formation des ponts disulfure (Ennahar *et al.*, 2000). Les bactériocines de la sous classe IIa ont intéressé de nombreux chercheurs, du fait de leurs propriétés physico-chimiques et leur activité anti-*Listeria*. La biosynthèse de la sous classe IIa. L'entérotoxine P produite par *Enterococcus faecium* P13 est une bactériocine appartenant à la classe IIa (Cintas *et al.*, 1997).

Certaines bactériocines de cette sous classe sont sécrétées par une voie appelée « la voie *sec-dependent*» (Keyser *et al.*, 2003). La sécrétion de la bactériocine se fait par une translocation du peptide à travers un pore formé par plusieurs protéines, le peptide leader est une séquence spécifique des protéines synthétisées par cette voie, il sera clivé lors de l'exportation à l'extérieur.

- Une autre voie de biosynthèse, généralement utilisée par les bactériocines de la classe IIa fait appelle au système GSP : voie générale de sécrétion (Figure 4), contenant deux protéines distinctes : ABC transporteur et une protéine accessoire, La protéine accessoire est ancrée vers la membrane extérieure de la cellule, alors que le ABC transporteur est ancré dans la membrane vers l'intérieur de la cellule.
- La régulation de la biosynthèse des bactériocines de la classe IIa, fait appel à un système «*Quorum sensing* » à 3 composantes : une protéine d'induction, une histidine kinase et un régulateur de réponse, ces protéines sont co-transcrites.

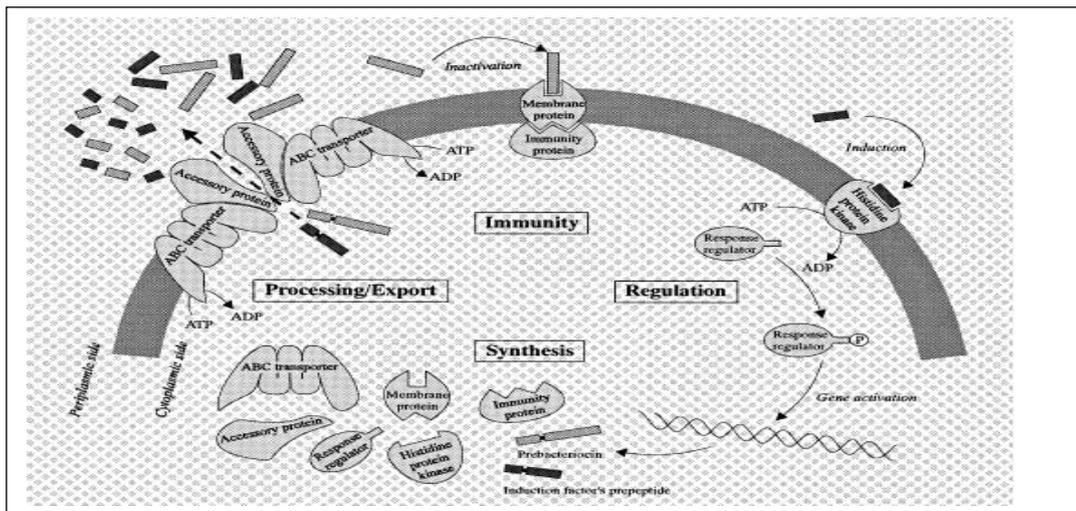


Figure 7. Schéma de la biosynthèse de la production des bactériocines de la sous classe IIa, montrant: la régulation, la synthèse, le transport et l'immunité (Ennahar *et al.*, 2000).

La biosynthèse des bactériocines varie d'une classe à une autre, sa complexité dépend de la composition chimique de cette molécule.

- 5.3. **La biosynthèse des bactériocines de classe III** est plus complexe, ces bactériocines ont une structure tridimensionnelle d'une protéine à poids moléculaire, qui peut atteindre les 30 KDa.
- 5.4. **La biosynthèse des bactériocines de la classe IV** nécessite la liaison des composés lipidique ou des composés glucidique au prépeptide pour sa fonction biologique.

6. Mécanisme d'action des bactériocines

Il varie d'une classe à une autre, en général, les bactériocines interagissent avec la membrane cytoplasmique de la cellule hôte. Le mode d'action des bactériocines, peut être bactéricide ou bactériostatique, déterminés respectivement par la mort cellulaire ou l'extension de la phase logarithmique, de la cellule sensible.

6.1. Les lantibiotiques

Ils interagissent soit par des interactions électrostatiques, soit par liaison au précurseur du peptidoglycane, le lipide II (un récepteur spécifique), cette liaison va permettre la formation des pores. Le maintien de ces derniers, au niveau membranaire, empêche la régénération de la paroi cellulaire (Figure 8). La formation des pores cause l'efflux des petits composés intracellulaires, comme les ions et les acides aminés. Cet efflux provoque le déséquilibre de la force proton motrice, de part et d'autre de la membrane, l'arrêt des fonctions cellulaires et la mort de la cellule (Patton *et al.*, 2005).

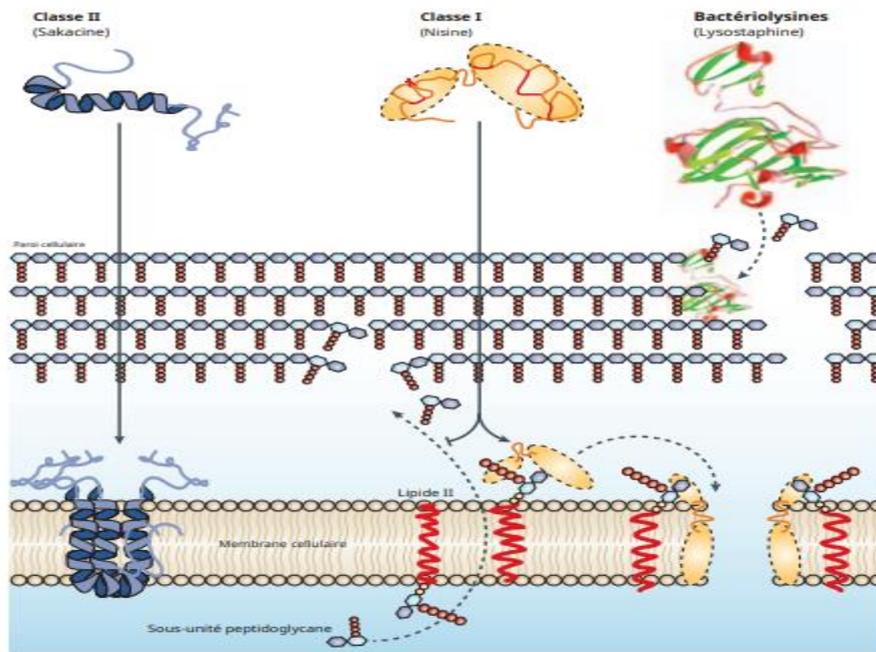


Figure 8. Mode d'action des bactériocines de bactéries lactiques (Patton *et al.*, 2005).

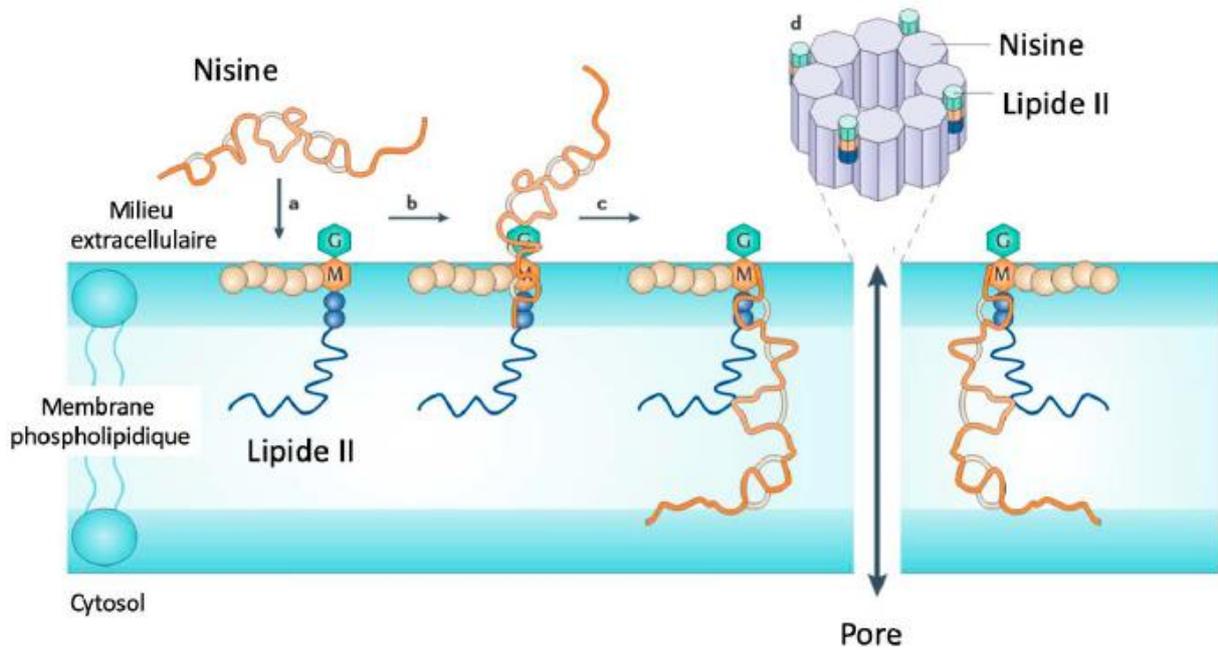


Figure 9. Mécanisme d'action de la nisine (Patton *et al.*, 2005).

- a) : le rapprochement du lantibiotique de la membrane plasmique de l'hôte.
- b) : l'adsorption du lantibiotique au lipide II.
- c) : la formation du pore.
- d) : la structure complexe du pore formée par 8 molécules de nisine et 4 lipides II, générant un pore (2nm).

6.2. Les bactériocines de classe II

L'action des bactériocines de la classe II se fait généralement, par l'adsorption à la membrane, son insertion et la formation des pores.

6.2.1. Le mécanisme d'action supposé des bactériocines de classe IIa est l'interaction de la bactériocine avec la membrane ou un récepteur spécifique, la « mannose perméase », pour ensuite former un pore dans la membrane de la cellule, ce qui induit la perméabilisation de la membrane, la dissipation des deux composantes de la force proton motrice et la mort de la cellule.

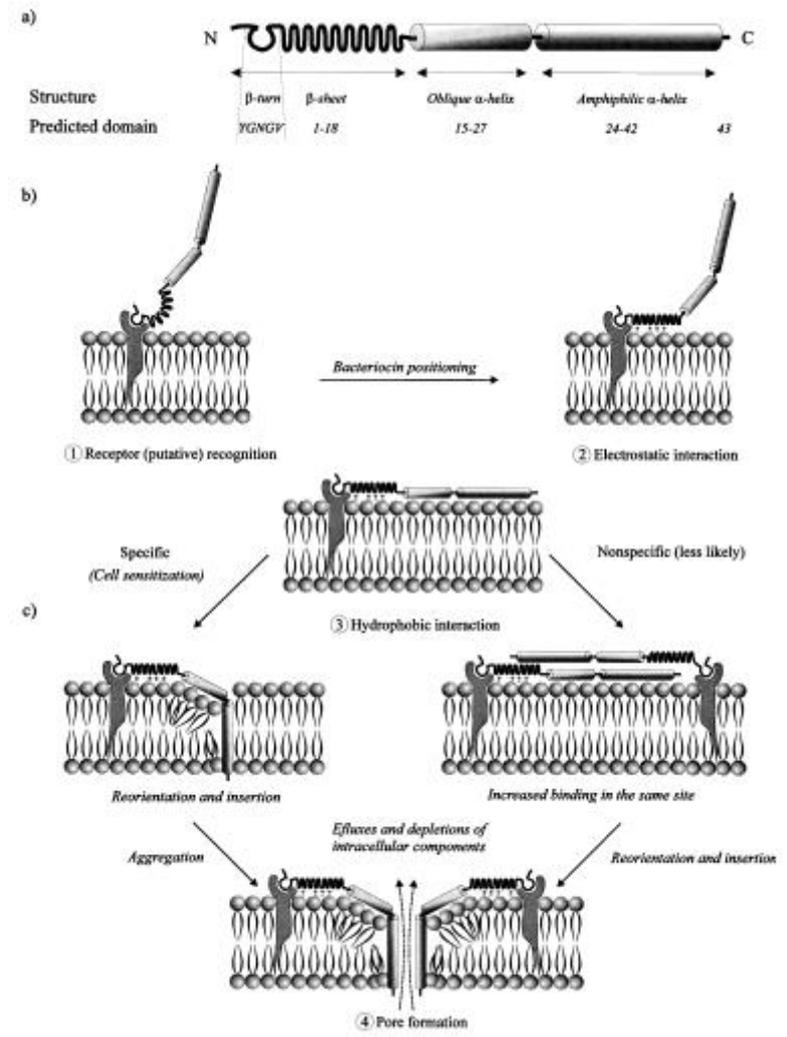


Figure 10. Représentation schématique de la structure d'un modèle de bactériocine de classe IIa et de l'emplacement prédit de ses domaines par rapport à la membrane cellulaire cible : (a) domaines structuraux prédits par la bactériocine ; (b) les interactions possibles de chaque domaine avec la surface membranaire ; (c) insertion de bactériocine et formation de pores hydrophiles. La face hydrophobe du peptide est ombrée en sombre et la face hydrophile est ombrée en clair (Ennahar *et al.*, 2000).

6.2.2. Les bactériocines de classe IIb nécessitent la présence des deux peptides pour être actives. Ces bactériocines perméabilisent la membrane des bactéries cibles en formant des pores provoquant ainsi une fuite d'ions et une dépolarisation membranaire. La lactococcine G par exemple perméabilise la membrane pour divers cations (Na⁺, K⁺, Li⁺, Cs⁺, Rb⁺), mais pas pour les protons H⁺, la plantaricine EF laisse passer divers ions monovalents dont H⁺ et la lactacine F est perméable pour les ions K⁺ et le phosphate. Il semble donc que les bactériocines de classe IIb forment des pores complexes et sélectifs permettant uniquement le passage de certains ions.

Les peptides constituant les bactériocines de classe IIb sont non-structures dans l'eau mais forment une hélice- α au contact d'entités membranaires.

La structuration en hélice- α augmente lorsque les deux peptides sont ajoutés simultanément. Dans la membrane, les deux peptides interagissent via leurs motifs GxxxG, qui permettent un contact intime entre les hélices- α . Cette proximité maximise les interactions de type van der Waals et/ou les liaisons hydrogènes entre les deux hélices. Des analyses mutationnelles ont confirmé l'importance des motifs GxxxG dans l'activité de la lactococcine G et de la plantaricine EF.

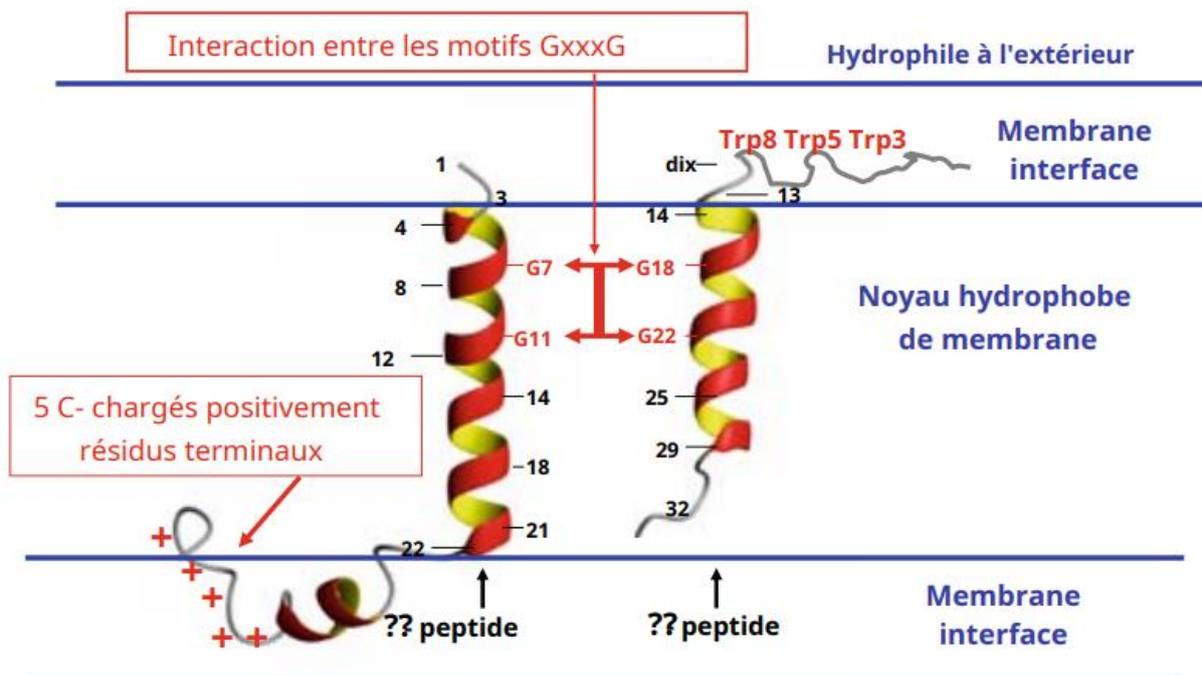


Figure 11.Modèle d'interaction de la lactococcine G avec la membrane

Les peptides α et s de la lactococcine G forment chacun une hélice- α dans la membrane. Ils interagissent via leurs motifs GxxxG (en positions 7-11 et 18-22 respectivement). Le peptide α possède 5 acides aminés chargés positivement qui s'enfoncent dans la membrane et le peptide s possède 3 résidus tryptophanes se trouvant à l'interface membrane-milieu extracellulaire. (Mode-of-Action of the Two-Peptide (Class-IIb)) (Cintas *et al.*, 1997).

7. Biologie moléculaire des bactériocines

Le phénomène répandu de production de bactériocines parmi les LAB est sans doute en partie dû au fait que les gènes concernés sont souvent associés à des éléments transférables tels que des transposons conjugatifs ou des plasmides. Cette association naturelle peut être exploitée pour faciliter la production de bactériocines hétérologues. Par exemple, les 10 gènes nécessaires à la production et à l'immunité du lantibiotique à deux peptides lacticine 3147 sont situés sur un plasmide conjugatif de 60 kb, ce qui a permis de transférer ce trait de manière non-recombinante à partir de la souche mère *L. lactis* DPC3147 à une grande variété de souches de démarrage commerciales, en sélectionnant simplement l'immunité aux bactériocines comme marqueur pour le transfert de plasmides⁶⁴. Les bactériocines sont généralement synthétisées sous la forme d'un pré-peptide inactif qui comprend une séquence leader N-terminale. La séquence leader maintient vraisemblablement la bactériocine sous une forme inactive au sein de la cellule productrice, facilite l'interaction avec le transporteur et, probablement dans le cas des lantibiotiques, joue un rôle dans la reconnaissance par la machine de modification (Cintas *et al.*, 1997).

Ce leader est généralement clivé lors de l'exportation par un système de transport de bactériocine dédié ou, moins fréquemment, par la voie de sécrétion générale (Sec) de la cellule. Il est à noter que quelques bactériocines qui semblent manquer de séquences de tête ont également été identifiées³¹. Les gènes qui codent pour les prépeptides structuraux sont généralement étroitement associés à des gènes qui codent pour des produits impliqués dans la régulation, l'exportation, l'auto-immunité et, dans le cas des lantibiotiques, la modification. L'exportation des bactériocines est généralement réalisée par un transporteur dédié à la cassette de liaison à l'ATP (ABC) associé à la membrane qui peut également contenir un domaine N-terminal protéolytique appartenant à la famille des protéases à cystéine qui est responsable du clivage du peptide leader. Dans le cas de certains lantibiotiques, le clivage peut être dû à une sérine protéase spécifique⁷¹. Pour les peptides de classe II, on pense que les protéines accessoires facilitent la translocation membranaire et/ou le clivage du peptide leader, mais leur rôle spécifique n'a pas encore été établi. La régulation de la production de bactériocines et de l'immunité est le plus souvent médiée par des systèmes de transduction du signal à deux composants, souvent dans le cadre d'un mécanisme de détection de quorum (FIGURE 3). Dans certains cas, plus d'un régulateur de réponse peut être impliqué. D'autres types de régulateurs, tels que les répresseurs de la famille Xre, ont également été décrits. BACTÉRIOCINOGENÈSE les bactéries possèdent également des gènes qui codent pour les mécanismes immunitaires. Ces systèmes permettent de faire la distinction entre « soi » (producteur) et « non-soi » (Ennahar *et al.*, 2000).

8. Auto-immunité

La production de toute bactériocine nécessite que la bactérie productrice y soit immunisée. Cette immunité implique généralement une petite protéine d'immunité spécifique et/ou un ABC transporteur. La plupart du temps l'immunité à une bactériocine est spécifique, bien que quelques exemples de protéine d'immunité protégeant la bactérie contre plusieurs bactériocines similaires aient été rapportés dans la littérature (Cotter *et al.*, 2005).

8.1. Immunité aux lantibiotiques

L'immunité à la nisine implique l'ABC transporteur NisFEG dont la fonction est probablement d'expulser les molécules de nisine se trouvant dans la membrane vers le milieu. Elle implique aussi la protéine d'immunité NisI, qui peut être membranaire ou sécrétée, et qui séquestre les molécules de nisine (Draper et al., 2008).

De manière générale, il a été proposé que l'ABC transporteur est important pour l'immunité aux antibiotiques se liant au lipide II en permettant l'expulsion de la bactériocine (Draper et al., 2008), tandis que la protéine d'immunité est importante pour empêcher la formation de pores (Geiger et al., 2019).

8.2. Immunité aux pédiocines

Concernant les bactériocines de type pédiocine, l'immunité est procurée par une seule protéine dont la taille varie entre 88 et 115 acides aminés. Cette protéine interagit avec le complexe formé entre la perméase du système Man-PTS et la bactériocine uniquement lorsque la bactériocine est présente (Diep et al., 2007). Elle a probablement pour but d'empêcher la formation de pores par la bactériocine ou d'obstruer ces pores pour éviter la fuite d'ions. En construisant des protéines d'immunités hybrides, il a été montré que c'est la partie C-terminale qui est impliquée dans la reconnaissance spécifique de la bactériocine associée. Cependant, aucune interaction directe entre la protéine d'immunité et la bactériocine n'a pu être observée *in vitro*. Il est donc possible que cette interaction n'ait lieu que lorsque la bactériocine est proprement structurée dans un environnement membranaire ou que cette interaction ne soit possible que lorsque la bactériocine est directement liée à son récepteur, la perméase du Man-PTS (Diep et al., 2007).

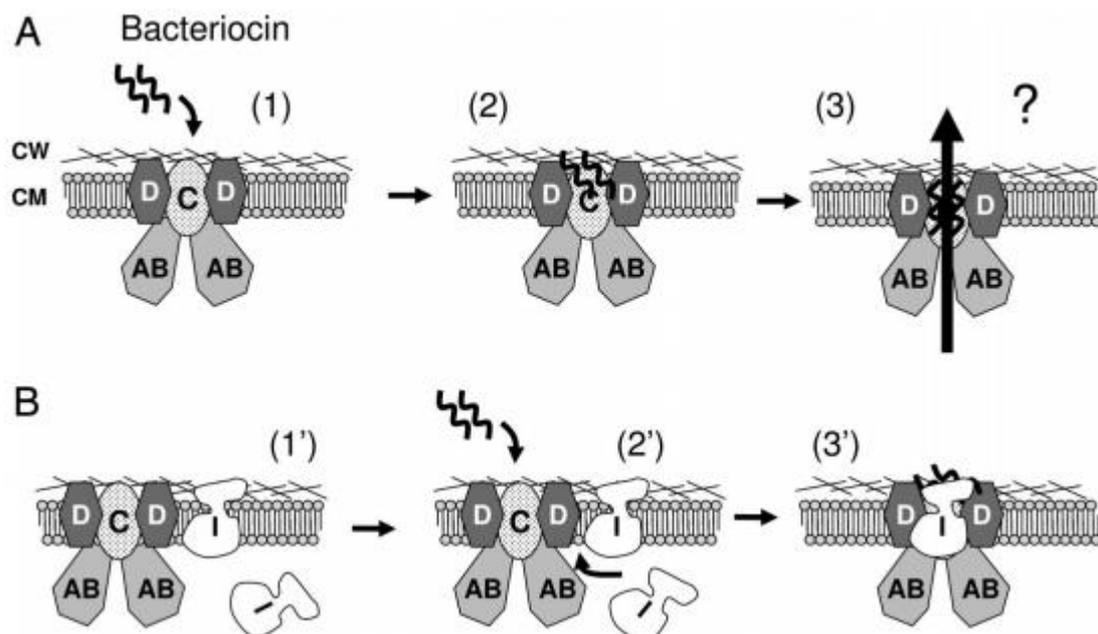


Figure 12. Modèle de destruction et d'immunité des cellules cibles pour la lactococcine A et probablement aussi pour la lactococcine B et certaines bactériocines de type pédiocine (Diep et al., 2007).

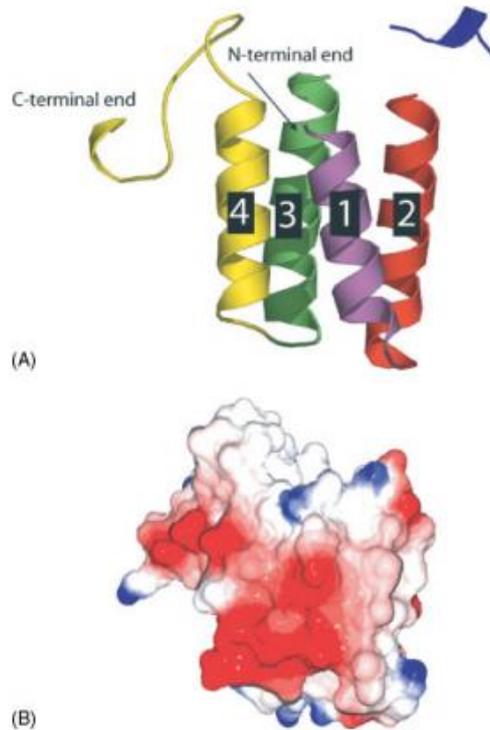


Figure 13. La structure tridimensionnelle de l'immunité protéine (entA-im)

pour l'entéroccine A (A) représentée sous forme de diagramme en ruban (les hélices sont numérotées de 1 à 4 à partir de la N-extrémité terminale) et (B) montrant la surface moléculaire et la distribution de la charge de surface (le rouge indique la charge négative et la charge positive bleue) (Diep *et al.*, 2007).

8.3. Immunité aux bactériocines de classe IIb

L'immunité aux bactériocines de classe IIb est en général conférée par une petite protéine contenant des hélices transmembranaires (Nissen-Meyer *et al.*, 2011). Cette localisation membranaire est cohérente avec le mode d'action de ces bactériocines. En utilisant des combinaisons de peptides hybrides de deux bactériocines de classe IIb similaires, la lactococcine G et l'enterocine 1071, il a été montré que la protéine d'immunité interagit avec une région spécifique de chacun des deux peptides composant la bactériocine. Cependant, le mécanisme d'action exact de la protéine d'immunité n'est pas connu (Oppegard *et al.*, 2010). Un autre type d'immunité a été décrit dans le cas de la plantaricine EF et la plantaricine JK. Elle est conférée par des protéines à domaine Abi. Chez les procaryotes, des gènes codant pour les protéines à domaine Abi sont fréquemment retrouvés dans des loci encodant des bactériocines. Les protéines à domaine abi associées aux loci des plantaricines EF et JK confèrent une immunité à ces bactériocines lorsqu'elles sont surexprimées chez une souche sensible (Kjos *et al.*, 2010a). Cependant, le mécanisme exact par lequel les protéines à domaine abi confèrent l'immunité n'est pas connu.

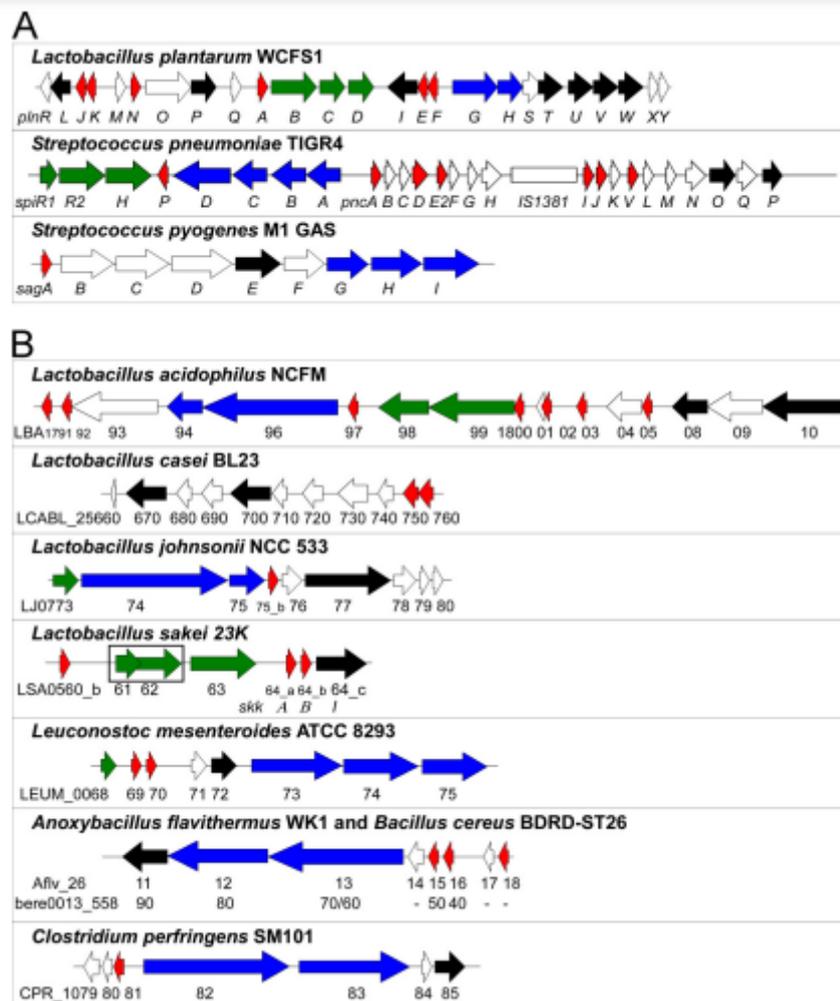


Figure 14. Bactériocine associée à Abi et loci de type bactériocine. (A) Trois loci connus de bactériocine contenant des gènes Abi (Oppegard et al., 2010).

9. Résistance aux bactériocines

Le potentiel de développement d'une résistance parmi les espèces cibles est une cause évidente de préoccupation si les bactériocines doivent être largement utilisées dans les stratégies de conservation des aliments. La plupart des recherches dans ce domaine se sont concentrées sur des bactériocines spécifiques, telles que la nisine et certains des peptides de classe IIa. La fréquence de la résistance spontanée à la nisine dans *L. monocytogenes* varie de 10^{-2} à 10^{-7} d'une manière dépendante de la contrainte, tandis que des mutants stables et résistants à la nisine de *Streptococcus pneumoniae* peut survenir (le CMI passe de 0,4 à 6,4 mg l⁻¹) suite à une exposition en série au lantibiotique. Chez ces mutants spontanés, la résistance est en corrélation avec les modifications de l'enveloppe cellulaire telles que les altérations de la charge et de la fluidité membranaires. Épaisseur de paroi cellulaire, charge de la paroi cellulaire et leurs combinaisons, qui surviennent après une exposition directe à un faible niveau de lantibiotique ou dans le cadre d'une réponse adaptative à un autre stress. Le(s) mécanisme(s) spécifique(s) par lequel les cellules deviennent résistantes à la nisine ne sont pas bien compris bien qu'il soit évident que les variations de la teneur en lipide II ne sont pas

responsables. Loci génétiques associés au développement d'une résistance accrue à la nisine, ou une tolérance innée à la nisine, ont été identifiés (**Kjos et al., 2010a**).

Le mécanisme de résistance aux bactériocines de classe II le mieux étudié est celui observé chez les résistants de classe IIa. *L. monocytogenes*, dans laquelle la résistance semble être liée à une expression réduite d'une perméase de mannos du système phosphotransférase. Semblable aux mutants résistants à la nisine, d'autres facteurs tels que la fluidité de la membrane cellulaire et charge de surface cellulaire impact sur la résistance. Avec des recherches plus poussées, des mécanismes supplémentaires deviendront sans aucun doute apparents. La production d'une bactériocine par un *Streptocoque mutant* la contrainte est inhibée par *Streptocoque gordonii* par l'inactivation du peptide d'induction correspondant, qui fournit un exemple intéressant de communication médiée par la bactériocine qui implique des espèces concurrentes. D'autres études seront nécessaires pour déterminer la fréquence à laquelle apparaît la résistance à d'autres bactériocines. Le risque de développement d'une résistance industriellement significative à grande échelle pourrait être mieux limité par l'utilisation intelligente de la technologie des obstacles, c'est-à-dire le concept de combinaison de plusieurs facteurs (y compris le pH, l'osmolarité et la température) pour conserver les aliments. Bien que l'utilisation combinée de différentes bactériocines puisse être efficace, une résistance croisée aux bactériocines de classe I et de classe II a été trouvée dans certains cas. Il convient de noter que les bactériocines utilisées correctement dans une approche d'obstacle ne devraient contrôler que de faibles niveaux d'organismes contaminants, car elles ne devraient être utilisées que pour augmenter, et non remplacer, les bonnes pratiques de fabrication des aliments. Cela crée une situation différente de l'utilisation d'antibiotiques en milieu clinique, où ces inhibiteurs sont utilisés pour éliminer les infections établies et généralement un nombre élevé de bactéries cibles, augmentant ainsi considérablement la probabilité de développement d'une résistance (**Geiger et al., 2019**).

9 Applications des bactériocines

Les bactériocines sont utilisées comme bioconservateurs sous une forme purifiée ou partiellement purifiée.

Beaucoup d'études ont montré que la bactériocine semi-purifiée est plus efficace in vitro que la bactériocine purifiée, néanmoins, les préparations partiellement purifiées peuvent contenir d'autres métabolites (acide lactique) et d'autres composés comme les protéines (**Gálvez et al., 2007**).

9.1 Dans l'industrie alimentaire

Les bactériocines sont habituellement reconnues comme sûres, sont sensibles aux protéases digestives et ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes. Du fait qu'elles sont des substances naturelles, l'emploi des bactériocines permettrait d'avoir des produits plus sains et réduirait l'utilisation des agents chimiques de conservation

Ces dernières années, l'application des bactériocines dans la technologie a gagné une grande attention. En effet, plusieurs bactériocines montrent des effets synergiques ou additionnels lorsqu'elles sont utilisées en combinaison avec d'autres agents antimicrobiens, incluant des conservateurs chimiques, des composés phénoliques naturels (**Galvarez et al., 2007**).

Les produits altérés par les microorganismes pathogènes et d'altération, constituent une perte économique considérable. L'amélioration de la conservation et de la qualité du produit fini, est un défi majeur des industriels agroalimentaires. L'application des bactériocines comme bioconservateurs permet d'offrir les bénéfices suivants (Thomas *et al.*, 2000) :

- Une extension de la durée de vie des aliments.
- Une protection durant les traitements thermiques.
- Une diminution des risques de contamination par les bactéries pathogènes durant la chaîne de production.
- Une diminution de la perte économique causée par les microorganismes d'altération.
- La réduction de l'ajout des conservateurs chimiques.
- La mise au point de nouveaux aliments avec moins d'acide et de sels, et contenant plus d'eau.
- Une meilleure préservation des aliments et qu'ils soient riches en vitamines et en qualités organoleptiques.

La bactériocine peut être additionnée sous forme purifiée ou semi-purifiée. Cependant plusieurs facteurs peuvent influencer l'efficacité de la bactériocine dans les aliments (Tableau 11).

Tableau 11. Facteur influençant l'activité de la bactériocine dans l'aliment (Gálvez *et al.*, 2007).

Facteurs liés à l'alimentation
<ul style="list-style-type: none"> – Conditions de transformation des aliments – Température de conservation des aliments – pH des aliments et instabilité de la bactériocine aux changements de Ph – Inactivation par les enzymes alimentaires – Interaction avec les additifs/ingrédients alimentaires – Adsorption de la bactériocine sur les composants alimentaires – Faible solubilité et répartition inégale dans la matrice alimentaire – Stabilité limitée de la bactériocine pendant la durée de conservation des aliments
Le microbiote alimentaire (La flore de l'aliment)
<ul style="list-style-type: none"> – Charge microbienne – Diversité microbienne – Sensibilité aux bactériocines – Interactions microbiennes dans le système alimentaire
Les bactéries cibles (Les bactéries indésirables)
<ul style="list-style-type: none"> – Charge microbienne Sensibilité à la bactériocine (type Gram, genre, espèce, souches) – Stade physiologique (cellules en croissance, au repos, affamées ou viables mais non cultivables, cellules stressées ou sublétalement lésées, endospores...) – Protection par barrières physico-chimiques (microcolonies, biofilms, slime) – Développement de résistance/adaptation

9.2 Dans Applications cliniques

Bien que cette revue ait souligné le rôle (existant et potentiel) des bactériocines LAB dans les aliments, la non-toxicité des lantibiotiques et leur activité contre les agents pathogènes humains et animaux à Gram positif ont conduit à des recherches étudiant leur application clinique potentielle.

En particulier, l'élucidation du mécanisme d'action précis de certains lantibiotiques et de leur activité contre les agents pathogènes multirésistants par un nouveau mécanisme en fait une option intéressante en tant qu'agents thérapeutiques possibles (Diep *et al.*, 2007).

Les lantibiotiques à large spectre pourraient théoriquement être utiles contre toute pathogène clinique à Gram positif humain ou animal. Par exemple, la lacticine lantibiotique à deux peptides 3147 *in vitro* activité contre *Staphylococcus aureus* (y compris résistant à la méthicilline *S. aureus* (SARM)), entérocoques (y compris ERV), *streptocoques* (*S. pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus mutans*), *Clostridium botulinum*, et *Propionibacterium acnes*. Initiale *in vivo* des essais avec des modèles animaux ont démontré le succès des lantibiotiques dans le traitement des infections causées par *S. pneumoniae*, et SARM, et dans la prévention de la carie dentaire et de la gingivite (Thomas *et al.*, 2000).

L'utilisation de la nisine pour des applications cliniques humaines a été concédée sous licence à Biosynexus Incorporated par Nutrition 21 et ImmuCell Corporation a concédé sous licence l'utilisation du produit antimastitique contenant de la nisine Mast Out à Pfizer Animal Health. La mammite bovine est définie comme une inflammation de la mamelle et est la maladie la plus persistante chez les vaches laitières. La nisine est également utilisée comme agent actif dans Wipe-Out (un chiffon pour trayons), et il a été démontré que les joints de trayons contenant de la lacticine-3147 (Cross VetpharmGroup Ltd) empêchent l'infection délibérée par les staphylocoques mastitiques et les *streptocoques* dans des essais de provocation animale (Figure 15).

Une souche productrice du lantibiotique mutacine 1140 entre en essai clinique de Phase I aux États-Unis en vue d'un traitement substitutif, et le complément alimentaire BLIS K12 protégé-gorge, qui contient un *Streptocoque salivaire* qui produit deux lantibiotiques salivaricine A2 et B, est vendu en Nouvelle-Zélande comme inhibiteur de la bactérie responsable de la mauvaise haleine.

D'un point de vue médical non antimicrobien, la cinnamycine-like les antibiotiques ont suscité un intérêt en raison de leurs nouvelles activités contre les fonctions d'enzymes humaines spécifiques d'importance médicale, telles que la phospholipase A2 et l'enzyme de conversion de l'angiotensine, et la nisine s'est également avérée avoir une efficacité contraceptive (Thomas *et al.*, 2000).

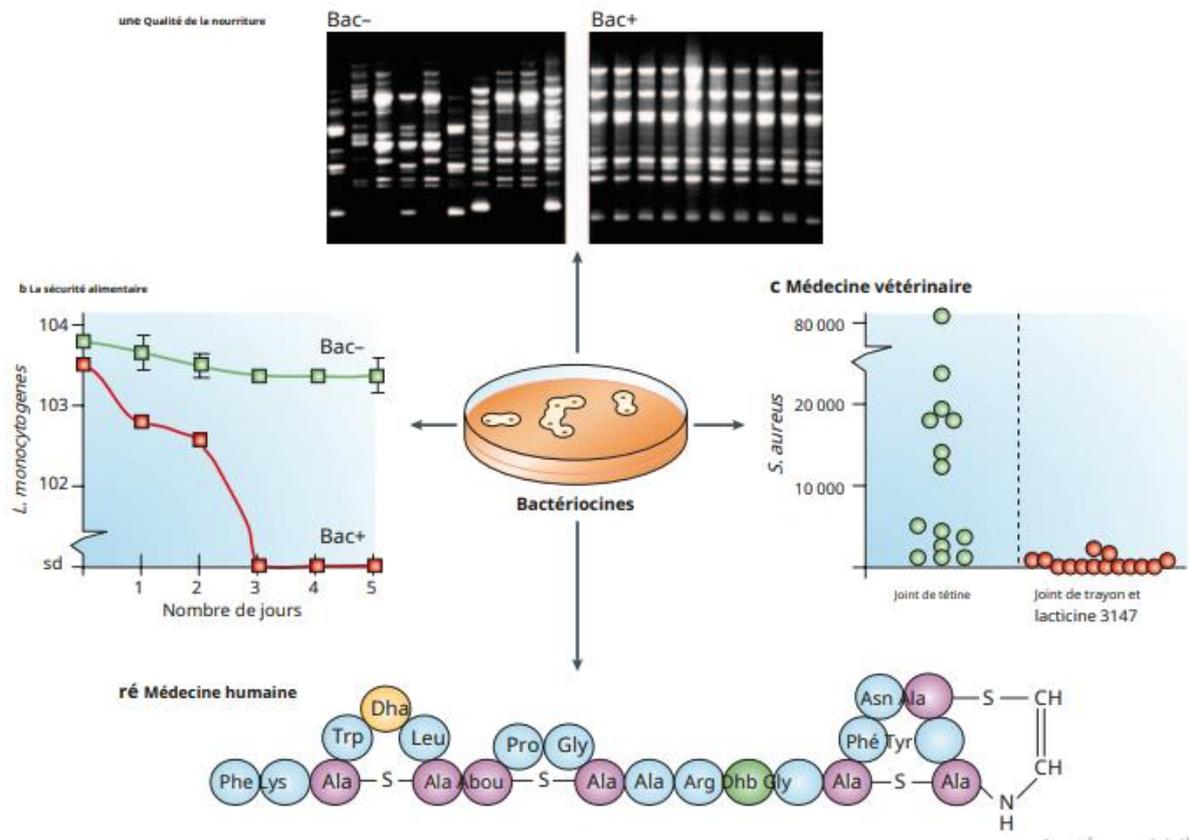


Figure 15. Applications sélectionnées des bactériocine (Oppegard et al., 2010).

Un nouveau domaine médical est en pleine expansion, il s'agit de l'utilisation de la bactériocine comme une conception rationnelle de médicaments. (Arnusch et al., 2008) ont conçu un hybride nisine-vancomycine, ce dernier est très actif contre les entérocoques résistants à la vancomycine.

Les différents domaines d'application des bactériocines des bactéries lactiques sont récapitulés dans la (Figure 16)

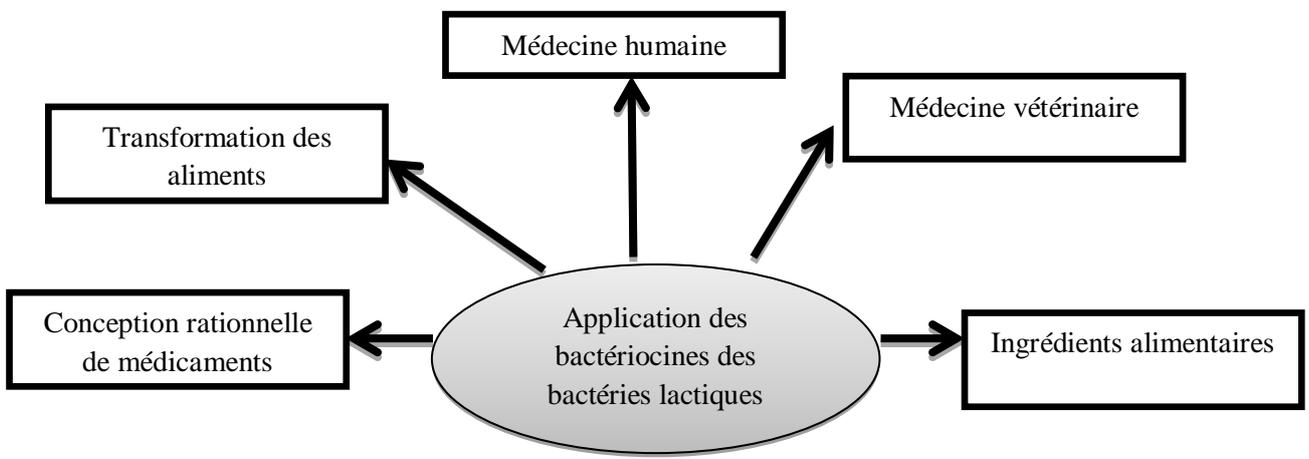


Figure 16. Différents domaines des applications des bactériocines des bactéries lactiques (Leblanc, 2010).

10 Facteurs influençant la production des bactériocines

L'ajout d'une culture protectrice, de bactéries bactériocinogènes permet d'inhiber les microorganismes pathogènes et d'altération, durant la conservation des aliments non fermentés. Cette culture peut se développer et produire la bactériocine, durant le stockage de l'aliment à basse température et/ou durant les conditions de traitements thermiques (Holzapfel et al., 1995).

En plus, des facteurs qui influencent l'activité de la bactériocine, d'autres affectent sa production (Gálvez et al., 2007), (Figure 17) :

- Une perte spontanée de l'effet inhibiteur de la bactérie.
- Une infection par des bactériophages.
- Antagonismes des autres bactéries contre la souche bactériocinogène.
- La bactérie productrice de bactériocine n'accomplit pas les propriétés désirées du ferment.
- Difficultés des manipulations génétiques et du transfert du caractère bactériocinogène dans les starters souhaités.
- La faible capacité de la souche à produire la bactériocine dans la matrice de l'aliment.

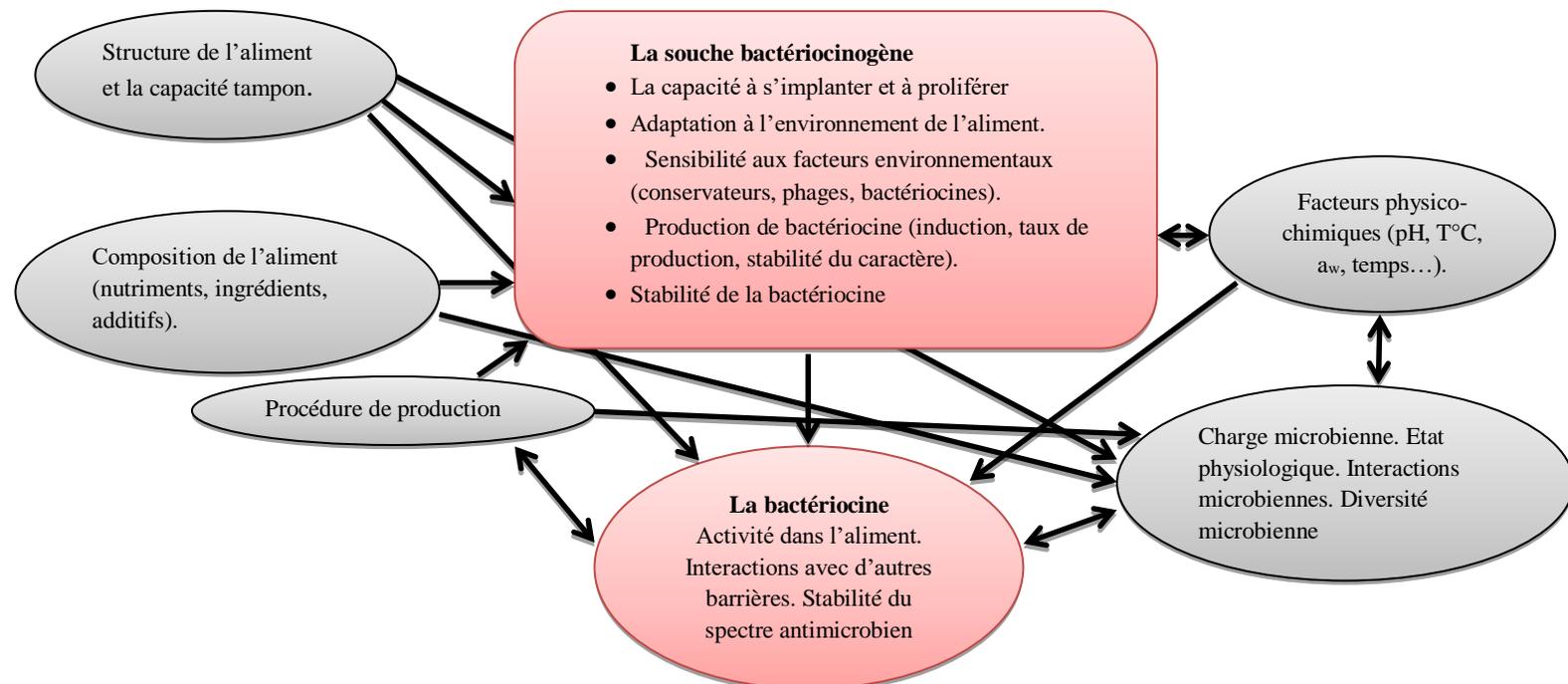


Figure 17. Les facteurs influençant la production et l'activité de la bactériocine, (Gálvez et al., 2007).

1. Mise en évidence de l'activité bactériocinogène

Les méthodes de détection des souches lactiques productrices de bactériocines sont basées sur la diffusion de ces substances protéiques dans un milieu de culture solide ou semisolide préalablement inoculé par une souche indicatrice (Elmoualdi *et al.*, 2008). Certaines bactériocines, comme la streptocine STH1, sont produites uniquement en milieu liquide.

1.1. Test des spots (spot on the lawn)

C'est une méthode permettant la recherche d'antagonisme de plusieurs souches à la fois, cet antagonisme peut être soit direct (simultané) ou indirect (différé).

- **Antagonisme direct** : il consiste à réaliser sur une gélose un tapis de la souche indicatrice, une culture fraîche de la souche test est ensuiteensemencée sur ce tapis sous forme de spots.

Après incubation, les boîtes sont examinées pour les zones d'inhibition. La densité du tapis cellulaire est un facteur déterminant dans cette méthode (Tagg *et al.*, 1976).

- **Antagonisme différé** : dans cette méthode, une préculture de la souche test estensemencée sur gélose sous forme de spots, une incubation est alors réalisée permettant le développement des colonies. Une gélose molle (0.75% d'agar) inoculée par un certain volume de la souche indicatrice est ensuite versée au dessus. L'inhibition se traduit par l'apparition des halos d'inhibition ($\geq 2\text{mm}$) autour des souches productrices (Mami *et al.*, 2008).

La bactérie test peut être tuée par chauffage ou par chloroforme avant de verser la gélose molle. Cependant, le chloroforme peut inactiver les substances inhibitrices. Pour éviter ce problème, une modification de cette méthode consiste àensemencer la souche indicatrice sur la face opposée par rapport à la souche test et présente également l'avantage d'exclure l'effet des bactériophages (Tagg *et al.*, 1976).

1.2. Méthode des puits

Cette méthode proposée par Barefoot et Klaenhammer (1983) consiste à inoculer la gélose fondue et refroidie à 45°C avec une préculture de la souche indicatrice. Après solidification, des puits sont creusés à l'aide d'un emporte-pièce ou un embout, puis remplis avec le surnageant préalablement stérilisé par filtration sur membrane de la culture à tester. Une pré-diffusion à 4°C durant 4H est réalisée suivie d'une incubation de 24H à 48H avant examen des zones d'inhibition. Une modification de cette méthode consiste à remplir les puits par une gélose contenant la souche à tester (Berecka *et al.*, 2009).

1.3. Méthode des disques

Dans cette méthode, un tapis de la souche indicatrice est réalisé sur la surface d'un milieu solide, ensuite des disques stériles de papier Whatman imbibés de surnageant de la culture à tester sont déposés sur ce tapis. Après incubation, les boîtes sont examinées pour la présence des zones d'inhibition (**Berecka et al., 2009**).

1.4. Méthode de plaques

Dans cette méthode la gélose est inoculée par 1ml de la souche à tester et incubée pendant 24H. Des plaques sont découpées de cette gélose puis placées sur une autre gélose inoculée de 0.5ml de la souche indicatrice. Après incubation, les boîtes sont examinées pour visualiser les zones d'inhibition (**Berecka et al., 2009**).

1.5. Méthode des microplaques

Cette méthode consiste à placer 25µl du surnageant de la souche à tester dans les cupules d'une microplaque, ensuite chaque cupule reçoit un volume de 175µl de bouillon approprié inoculé par 1% (v/v) d'une préculture de la souche indicatrice. Après incubation à la température optimale de cette dernière durant 20H, la croissance est examinée en mesurant la densité optique à 650nm (**Simova et al., 2009**).

2. Méthodes de purification des bactériocines

La purification d'une substance quelconque, synthétisée par une cellule vivante, est une tâche difficile à réaliser, du fait qu'elle se trouve dans un milieu complexe. Ce milieu contient d'autres éléments qui peuvent être nécessaires pour son activité.

Nous avons essayé de purifier notre bactériocine en commençant par une concentration au sulfate d'ammonium, puis un dessalage en utilisant une colonne de Sephadex G25, enfin nous avons essayé d'estimer le poids moléculaire de la bactériocine par électrophorèse Tricine SDS-PAGE (**Schägger & Von Jagow., 1987**).

2.1. Précipitation au sulfate d'ammonium

La précipitation au sulfate d'ammonium est la technique la plus utilisée pour la concentration des protéines destinées à la purification, le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ est le sel de choix en le comparant à d'autres sels à effet précipitant, il permet de maintenir la structure de la protéine donc son activité, de plus il est fortement soluble et pas coûteux (**Burgess, 2009**).

Le principe de cette méthode est de précipiter la bactériocine à partir d'une solution par addition de différentes concentrations de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ avec agitation. La bactériocine possède une surface hydrophobe, celle-ci dans une solution se trouve entourée de molécules d'eau. Une fois le sel ajouté, l'eau est impliquée dans sa dissolution entraînant une agrégation des molécules de bactériocines suivie de leur précipitation. Le culot est récupéré par centrifugation puis dissout dans le minimum de volume d'eau distillée ou de tampon et enfin le sel est éliminé par dialyse.

Plusieurs études ont utilisé la méthode de précipitation; **Hata et al. (2010)** ont purifié la plantaricine ASM1 en saturant la solution à 40% par le sulfate d'ammonium. Il en est de même pour **Albano et al. (2007)** et **Mkrtchyan et al. (2010)** dans la purification de l'acidocine LCHV alors que la précipitation de la plantaricine MG a nécessité une saturation

par le sel à 70% (**Gong et al., 2010**). L'inconvénient de cette méthode est qu'elle permet la précipitation de toutes les protéines existant dans la solution et son rendement est relativement faible (**Yang et al., 1992**).

2.2. Adsorption-désorption

Cette méthode de purification proposée par **Yang et al. (1992)** est basée sur la propriété d'adsorption des bactériocines à la paroi des cellules productrices et des autres bactéries à Gram positif. Le degré de cette adsorption est en fonction du pH. Ainsi, près de 93 à 100% des bactériocines sont adsorbées à des pH voisins de 6.0 et peu d'entre elles ($\leq 5\%$) sont adsorbées à pH de 1.5-2.0. La démarche consiste à chauffer la culture bactérienne afin de tuer les bactéries et désactiver les enzymes protéolytiques. Le pH est ensuite ajusté à 6.5 permettant l'adsorption des bactériocines à la surface des cellules mortes puis ces dernières sont récupérées par désorption dans le NaCl à pH 2 et centrifugation. Le rendement de cette méthode est plus élevé que celui de la précipitation (**Yang et al., 1992**). Plusieurs travaux (**Tagg et al., 1976 ; Pinto et al., 2009 ; Pringsulaka et al., 2011 ; Xie et al., 2011**) ont utilisé cette méthode pour la purification des bactériocines.

2.3. Dialyse

La dialyse sert à éliminer les composés de petite taille (acides organiques, sels, H₂O₂) de la solution de bactériocines en la plaçant dans un sac ou boudin de dialyse. Ce dernier est fermé des deux cotés et trempé dans un liquide dit de contre dialyse (eau distillée ou tampon).

Les pores de ce boudin laissent passer les substances de faible poids moléculaire tandis que les bactériocines seront retenues. Il est nécessaire de fréquemment changer le liquide de contre dialyse pour s'assurer de l'élimination complète des petites substances. La dialyse sert aussi à concentrer la solution de bactériocines en remplaçant le liquide de contre dialyse par une solution concentrée de polyéthylène glycol (PEG). Dans ce cas l'eau va quitter le boudin pour diluer cette solution de PEG entraînant la concentration des bactériocines (**Kamoun et al., 2003**).

2.4. Ultrafiltration

Cette méthode est généralement utilisée en dernier lieu après les chromatographies sur colonnes. L'ultrafiltration permet la concentration sélective des protéines en utilisant des membranes semi-perméables assurant le passage de l'eau et des petites molécules. L'air comprimé exerce une pression sur le liquide à ultrafiltrer et seules les molécules de faible poids moléculaire pouvant traverser la membrane, la bactériocine étant relativement grosse sera donc retenue par cette membrane (**Kamoun et al., 2003**).

- 2.5. Lyophilisation** Elle consiste à concentrer la solution protéique par élimination de l'eau en la faisant passer directement de l'état solide à l'état gazeux. La solution à concentrer est portée très brutalement à -70°C puis placée dans une enceinte étanche à vide très poussé ce qui permet de retirer l'eau sans altération des structures protéiques (**Kamoun et al., 2003**).
- 2.6. Electrophorèse sur gel polyacrylamide en présence de SDS** Cette technique sert à déterminer le poids moléculaire de la bactériocine. Elle est basée sur la séparation des protéines selon leur poids moléculaire sur gel de polyacrylamide réticulé. Ce gel constitue un filet à mailles plus ou moins fines permettant aux petites molécules de migrer plus loin. La solution tampon contenant le SDS (sodium dodécyl sulfate). sert à dissocier les sous-unités des protéines, les chaînes polypeptidiques fixent une quantité constante de SDS par gramme (1.4g SDS/g de protéine) et prennent la forme de bâtonnets dont la longueur est proportionnelle au nombre d'acides aminés donc au poids moléculaire, les petites chaînes migrant le plus loin. Leur révélation se fait par coloration. En faisant migrer un mélange de chaînes polypeptidiques de poids moléculaire connu, il est possible de déterminer le poids moléculaire des chaînes séparées. Cette méthode a permis de déterminer le poids moléculaire de la pédiocine LB-B1 produite par *Lactobacillus plantarum* et de plusieurs autres bactériocines (**Kamoun et al., 2003**).
- 2.7. chromatographie d'exclusion stérique (gel-filtration)** Cette méthode permet de séparer les molécules en fonction de leur taille. Les molécules trop volumineuses ne peuvent pas entrer dans les pores du gel, celles-ci sont donc exclues et sortent les premières de la colonne, tandis que les très petites molécules vont diffuser librement à l'intérieur du gel et seront par conséquent retardées et sortent les dernières. Les gels utilisés sont les gels de cellulose, d'agarose, d'agarose-acrylamide, de silice et de polyvinyle qui sont hydrophiles et stérilisables à l'autoclave. **Gong et al. (2010)** ont utilisé cette chromatographie pour purifier la plantaricine MG.

Conclusion

Les bactéries lactiques sont un outil de bioconservation efficace de nombreux aliments et Grâce à leur métabolisme, elles sont reconnues comme GRAS. Parmi les produits de leur métabolisme, les bactériocines sont des substances antimicrobiennes efficaces et très recherchées pour des applications en industrie agro-alimentaire, parapharmaceutique et pharmaceutique. C'est dans ce sens que s'inscrit l'objectif de notre travail qui consiste à détecter des bactéries lactiques bactériocinogènes et de faire une étude microbiologique, physico-chimique et biochimique de leurs bactériocines.

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens produits par certaines souches de bactéries lactiques et dont beaucoup ont une activité contre des bactéries pathogènes tels que *L.monocytogenes*.

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.

Résumé

Les bactéries lactiques jouent un rôle de premier plan dans la fabrication de produits alimentaires fermentés. Elles contribuent à l'amélioration du goût, de l'aspect et de l'innocuité microbiologique de l'aliment. Ces bactéries produisent en effet une variété de composés à action antimicrobienne tels les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl et les bactériocines.

Les bactériocines de bactéries lactiques sont l'objet d'une attention toute particulière depuis une dizaine d'années en raison de l'intérêt tant fondamental qu'appliqué qu'elles suscitent. Produites par de nombreuses espèces et dirigées contre des espèces homologues ou plus éloignées, comme *Listeria monocytogenes*, leur structure primaire a permis de définir une classification en trois classes (lantibiotiques, petites bactériocines non lantibiotiques et bactériocines de grande taille). Leur mode d'action a été également analysé et différents modèles existent pour expliquer la perforation des membranes des cellules cibles de ces bactériocines. La formation de pores membranaires se fait via un récepteur protéique (non lantibiotiques) ou par une insertion directe dans les bicouches phospholipidiques (lantibiotiques), plusieurs molécules d'une même bactériocine agissant en synergie dans tous les cas. L'analyse des déterminants génétiques des bactériocines montre une situation relativement simple dans le cas de la divergicine A (utilisation de la voie générale d'exportation) et plus complexe dans tous les autres cas décrits (voies d'exportation spécifiques faisant appel à des transporteurs de type ABC). La compréhension des mécanismes de production d'immunité, de régulation, mais aussi du mode d'action des bactériocines de bactéries lactiques et des résistances en émergence demande à être affinée à l'échelle moléculaire avant de pouvoir envisager de réelles applications dans les produits laitiers et carnés.

Mots-clés : bactérie lactique, Bactériocines, préservation biologique, Acides organiques, Lantibiotiques, *Listeria monocytogenes*.

Abstract

Lactic acid bacteria play a major role in the manufacture of fermented food products. They help to improve the taste, appearance and microbiological safety of the food. These bacteria indeed produce a variety of compounds with antimicrobial action such as organic acids, hydrogen peroxide, diacetyl and bacteriocins.

The bacteriocins of lactic acid bacteria have been the subject of special attention for ten years because of the interest both fundamental and applied they arouse. Produced by many species and directed against homologous or more distant species, such as *Listeria monocytogenes*, their primary structure has made it possible to define a classification into three classes (antibiotics, small non-lantibiotic bacteriocins and large bacteriocins). Their mode of action

has also been analyzed and different models exist to explain the perforation of the membranes of the target cells of these bacteriocins. The formation of membrane pores takes place via a protein receptor (non-lantibiotics) or by direct insertion into phospholipid bilayers (antibiotics), several molecules of the same bacteriocin acting in synergy in all cases. Analysis of the genetic determinants of bacteriocins shows a relatively simple situation in the case of divergicin A (use of the general export route) and more complex in all the other cases described (specific export routes using transporters. type ABC).

Understanding the mechanisms of production, immunity, regulation, but also the mode of action of lactic acid bacteria bacteriocins and emerging resistance needs to be refined at the molecular level before being able to consider real applications in products. dairy and meat.

Keywords: lactic acid bacteria, starter, *Listeria monocytogenes*, Bacteriocins, biological preservation, starter.

المخلص

مصطلح بكتيريا اللاكتيك يشمل البكتريات الناشئة من حمض اللاكتيك عن طريق تخمير هيدرات الكربون، او السماح لأحماض ph . او الاوساط البيئية اللاهوائية او اللاهوائية الاختيارية و تظهر سلبية الكاتلاز. الاكسجين قد يكون احيانا هو المادة المفاعلة لها، الذي يساهم في ينتج بيروكسيد الهيدروجين، الذي بدوره قد يكون سام. بعض السلالات تحتوي على سوبر اكسيد ديسموتاز المغنيسي و الذي يسمح بجرد او اقضاء الشوارد الحرة للأكسجين. البكتوريوسين الناتجة عن بكتيريا اللاكتيك عبارة ببتيديات جزئية ذات كتلة (وزن) جزيئي ضئيل، هذه الاخيرة لها نشاط موجه لتثبيط البكتيريا القريبة من سلالات المنتجة، عامة مجال عملها يكون محصور، بينما اغلبها عندها نشاط ضد الامراض الغذائية و مسببات الامراض الغذائية مثل الليستيريا مونوسيتوجين، تطبيق البكتوريوسين او السلالات المنتجة في العناصر الغذائية، من اجل تجنب فيها تكاثر او تطور بكتيريا المسببة للامراض، او لذلك تم النظر في تغييرها.

Références

1. ALAKOMI H.L., SKYTТА E., SAARELA M., MATTILA-SANDHOLM T., LATVA-KALA K., HELANDER I.M., 2000 - Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *App. Env. Microbiol.* 66(5) : 2001-2005.
2. AMMOR S., TAUVERON G., DUFOUR E., CHEVALLIER I., 2006 - Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogens bacteria isolated from the same meat smallscale facility. *Food Control.* 17: 454-468.
3. ANNAN PRAH A., AGYEMAN J.A., 1997 - Nutrient content and survival of selected pathogenic bacteria in Kenkey used as weaning food in Ghana. *Acta Trop.* 65:33-42.
4. ARNUSCH C.J., BONVIN A.M., VEREL A.M. , JANSEN W.T., LISKAMP R.M., KRUIJFF B. , PIETERS R.J., BREUKINK E., 2008 - The vancomycin-nisin(1-12) hybrid restores activity against vancomycin resistant Enterococci . *Biochemistry.* 47 :12661-12663.
5. 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.
6. BARRANGOU R., LAHTINEN S.J., IBRAHIM F OUWEHAND A.C., 2012 - Genus *Lactibacillus*, Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects, Fourth edition. Taylor et Francis Group.13: 77-91.
7. BATT C.A., 2000 - Lactococcus introduction. In *Encyclopedia of Food Microbiology*, Eds. Academic press, San Diego.1164-1166.
8. BAUER R., DICKS L.M.T., 2005 - Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *Int. J. Food Microbiol.*101 : 201-216.
9. BEAL C., MARIN M., FONTAINE E., FONSECA F., OBERT J.P., 2008 - Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. In : Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 661-765.
10. BENASLA A., 2012 - Production d'exopolysaccharides par des souches de lactobacilles. Thèse de Magister. Université d'ORAN ES-Senia.

11. BERECKA M. P., WASKO A., KOSTON D., 2009 - Comparison of different methods for detection of antimicrobial activity of probiotic strains of *Lactobacillus rhamnosus* against some food spoilage microorganisms. *Annales*. Vol. LXIV1.
12. BIAVATI B., VESCOVO M., TORRIANI S., BOTTAZZI V., 2000 - Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Ann. Microbiol.* 50: 117-131.
13. BIBEL D. J., 1988 - Elie Metchnikoff's bacillus of long life. *ASM News* , 54: 661-665.
14. BLANC J.G., TARANTO M. P., MOLINA V., SESMA F. B., 2010 - B - Group Vitamins Production by Probiotic Lactic Acid Bacteria. In *Biotechnology of lactic acid bacteria : Novel application*. Wiley- Blackwell. 2121 State Avenue, Ames, Iowa 50014-8300, USA.
15. BOURGEOIS C.M., LARPENT J.P., 1996 - *Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentations alimentaires*. Tec bacteria in food & Doc, Lavoisier. Paris. 432-704.
16. BROADBENT J.R., 2001 - Genetics of Lactic Acid Bacteria. In: *Applied Dairy Microbiology* (Marth E.H. et Steele J.L.). 2e Ed., Marcel Dekker, Inc. New.
17. CAI H., THOMPSON R., BUDINICH M.F., BROADBENT J.R. , STEELE J., 2009 - Genome sequence and comparative genome analysis of *Lactobacillus casei*: insights into their niche-associated evolution. *Genome boil. Evol.* 14:239-57.
18. CHEN H., HOOVER D.G., 2003 - Bacteriocins and their Food Applications. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*. 2: 82-100.
19. CINTAS L. M., CASAUS P., HAVARSTEIN L. S., HERNANDEZ P. E., NES, I. F., 1997 - Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Applied and Environmental Microbiology*. 63 : 4321-4330.
20. CINTAS L. M., HERRANZ C., HERNANDEZ P. E., CASAUS M. P., NES L. F. 2001 - Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci. Tech. Int.*7: 281-305.
21. COTTER P.D., HILL C., ROSS R.P., 2005 - Bacteriocins: developing innate immunity for food.
22. DIEP D.B., SKAUGEN M., SALEHIAN Z., HOLO H., NES I.F., 2007 - Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 2384–2389.
23. DOBROGOSZ W.J., LINDGREN S.E., 1990 - Antagonistic activity of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol Rev.* 7(1-7) : 149-63.

24. DORON S., SNYDMAN D. R. J. C. I. D. , 2015 - Risk and safety of probiotics. 60(suppl_2), 129-134.
25. DRAPER L.A., ROSS R.P., HILL C., COTTER P.D., 2008 - Lantibiotic immunity. *Curr Protein Pept Sci* 9:39–49.
26. DRIDER D., PREVOSTY H., 2009 - Bactéries lactiques. Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles. Ed. Economica. paris.
27. EATON T J., GASSON M. J., 2001 - Molecular screening of Enterococcus virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4), 1628-1635.
28. ELMOUALDI L., LABIOUI H., BOUSHAMA L., BENZAKOUR A., OUHSSINE M., EL YACHIOUI M., 2008 - Activité bactéricide d'une souche de *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 147 : 7-18.
29. EL-ZINEY M.G., UYTTENDAELE M., DEBEVERE, J., JAKOBSEN M., 1998 - Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *Journal of bacteriology*. 178(15).4472-83.
30. ENNAHAR S., SASHIHARA T., SONOMOTO K., ISHIZAKI A., 2000 - Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. Elsevier. *FEMS Microbiology Reviews*. 24 : 85-106.
31. FAO/WHO., 2002 - Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report, London Ontario, Canada
32. FIJAN S., 2014 - Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(5), 4745- 4767.
33. FOX P. F. , 1993 - Cheese: an overview. In *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, Ed. P. F. Fox. London. pp.1-36.
34. GALVEZ A., ABRIOUEL H., LOPEZ R.L., OMAR N.B., 2007 - Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. of Food Microbiol.* 120 :51-70.
35. GALVEZ A., VALDIVIA E., MAQUEDA M., MONTROYA E., 1985 - Production de substances de type bactériocine par les streptocoques du groupe D d'origine humaine. *Microbios* 43(176S):223- 232.
36. GEIGER C., KORN S.M., HASLER M., PEETZ O., MARTIN J., KOTTER P., MORGNER N., ENTIAN K.-D. 2019 - LanI-Mediated Lantibiotic Immunity in *Bacillus subtilis*: Functional Analysis. *Appl Environ Microbiol* 85, e00534-19.

37. GONG H. S., MENG X. C., WANG H., 2010 - Plantaricin MG active against Gram-negative bacteria produced by *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 isolated from "Jiaoke", a traditional fermented cream from China. *Food Cont.*, 21: 89-96.
38. GRATIA A., 1925 - Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de Colibacille. *Comptes Rendus Hebdomadaires de La Société de Biologie* 93, 1040–1041.
39. GUARNER, F., PERDIGON, G., CORTIER, G., SALMINEN, S., KOLETZKO, B., MORELLI, L., 2005 - Should yoghurt cultures be considered probiotic? *British Journal of Nutrition*, 93(6), 783-786.
40. GUNTHER H., WHITE H.R., 1961 - The cultural and physiological characters of the pediococci. *J.Gen .Microbiol.* 26: 185-97.
41. HADADJI M. , 2007 - Caractérisation technologique des bifidobactériues à intérêt thérapeutique. These de doctorat . Univ. d'oran .Algérie. 173p.
42. HENG N.C.K., TAGG J.R., 2006 - What's in a name? Class distinction for bacteriocins. *Nat.Rev. Microbiol.* 4.
43. HOLZAPFEL W.H., GEISEN R., SCHILLINGER U., 1995 - Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology.* 24: 343-362.
44. HOLZAPFEL W.H., HABERER P., GEISEN R., BJÖRKROTH J., SCHILLINGER U., 2001 – Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin.Nutr.*73: 365-373.
45. ISHIBASHI N., YAMAZAKI S., 2001 - Probiotics and safety. *The American Journal Of Clinical Nutrition*, 73(2), 465-470.
46. JACOB F., LWOFF A., SIMINOVITCH A., WOLLMAN E., 1953 - Définition de quelques termes relatifs à la lysogénie, *Ann. Inst. Pasteur.* 84:222-224.
47. JOHNSEN L., FIMLAND G., NISSEN-MEYER J., 2005 - The C-terminal Domain of Pediocinlike Antimicrobial Peptides (Class IIa Bacteriocins) Is Involved in Specific Recognition of the C-terminal Part of Cognate Immunity Proteins and in Determining the Antimicrobial Spectrum. *J Biol Chem* .280: 9243–9250.
48. KANT R., BLOM J., PALVA A., SIEZEN R.J., 2011 - W.M. de Vos. Comparative genomics of *Lactobacillus*. *Microbial biotechnology.* 4(3): 323-332.
49. KAWAI Y., ISHII Y., ARAKAWA K., UEMURA K., SAITOH B., NISHIMURA J., KITAZAWA H., YAMAZAKI Y., TATENO Y., ITOH T., SAITO T., 2004 -

Différences structurelles et fonctionnelles dans deux bactériocines cycliques avec les mêmes séquences produites par les lactobacilles. *Appl Environ Microbiol* 70:2906–2911.

50. KAWAI Y., KEMPERMAN R., KOK J., SAITO T., 2004 - Les bactériocines circulaires gasséricine A et circularin A. *Curr Prot Pept Sci* 5:393-398.
51. KHALIGHI, A., BEHDANI, R., KOUHESTANI, S., HEALTH., 2016 - Probiotics: A comprehensive review of their classification, mode of action and role in human nutrition. *Probiotics Prebiotics in Human Nutrition*, 10, 63646.
52. KJOS M., SNIPEN L., SALEHIAN Z., NES I.F., DIEP D.B., 2010 - The Abi Proteins and Their Involvement in Bacteriocin Self-Immunity. *J Bacteriol* 192, 2068–2076.
53. KLAENHAMMER T. R., 1988 - Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Bioch.* 70:337-349.
54. KUBOTA H., TSUJI K., MATSUDA K., KURAKAWA T., ASAHARA T., NOJIMOTO K., 2010 - Detection of human intestinal catalase negative Gram positif cocci by rRNA-targeted reverse transcription- PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 5440-5451.
55. LAHTINEN S., OUWEHAND A.C., SALMINEN S., WRIGHT A.V., 2012 - Lactic Acid Bacteria Microbiological and functional aspects Fourth edition Taylor & Francis Group. Boca Raton
56. LANGELLA P., NOUAILLE S., COMMISSAIRE J., BOLOTINE A., GRUSS A., LE LOIR Y., 2001 - Characterization of host factors affecting heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*. *Lait* 81, 19-28.
57. LIMSOWTIN G.K.Y., BROOME M.C., POWELL I.B., 2002 - Lactic acid bacteria, taxonomy. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 1470–1478.
58. London New York.
59. LUBELSKI J., RINK R., KHUSAINOV R., MOLL G.N., KUIPERS O.P., 2008 - Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin. *Cell. Mol. Life Sci.* 65: 455-476.
60. LUDWIG D.S., KABAT ZINN J., 2008 - Mindfulness in medicine. *Jama.* 300: 11-1350.
61. MALÍKOVÁ L., WEIS J., HRNČÁR C., 2020 - Effect of administration of probiotic preparation with strain of *Lactobacillus fermentum* on the weight gain of the young pigeons. *Journal of Microbiology, Biotechnology Food Sciences*, 9(4), 1469-1476.

62. MAMI A., HENNI J. E., KIHAL M., 2008 - Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from Algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus*. *World J. Dairy & Sci.*, 3: 39-49.
63. MAQUEDA M., GALVEZ A., BUENO MM., SANCHEZ-BARRENA MJ., GONZALEZ C., ALBERT A., RICO M., VALDIVIA E., 2004 - Peptide AS-48 : prototype d'une nouvelle classe de bactériocines cycliques. *Curr Prot Pept Sci* 5:399-416.
64. MATTARELLI P., BIAVATI B., 2014 - The genera *Bifidobacterium*, *Parascardovia* and *Scardovia*. *Lactic acid bacteria, Biodiversity and taxonomy*. John Wiley et Sons, Ltd: 509-541.
65. MCAULIFFE O., ROSS R.P., HILL C., 2001 - Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.* 25 : 285-308.
66. MCKAY L.L., BALDWIN K.A., 1990 - Applications for biotechnology : present and future improvements in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 87 : 3-14.
67. METCHNIKOFF E., 1907 - The prolongation of life. In *Optimistic Studies* (Heinemann W.,Ed.), G. P. Putnam and Sons, London, UK. pp. 1-100.
68. MONNET V., LATRILLE E., BEAL C., CORRIEU G., 2008 - Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In : *Bactéries lactiques de la génétique aux ferments* (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 512-592.
69. MORONI O., 2007 - Contribution à l'étude du rôle des probiotiques dans le contrôle et la prévention des infections entériques à *Listeria monocytogenes* : analyse in vitro et étude in vivo des mécanismes d'action antimicrobien. Thèse présentée à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval.146p.
70. PATTON G.C., VAN DER DONK W.A., 2005 - New developments in lantibiotic biosynthesis and mode of action. *Curr. Opin. Microbiol.* 8:543-551.
71. PFEILER E.A., KLAENHAMMER T.R. , 2007 - The genomics of lactic acid bacteria. *Trends in microbiology.* 15(12): 546-553.
72. PODOLAK P.K., ZAYAS J.F., KASTNER C.L., FUNG D.Y.C., 1996 - Propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In : *Bactéries lactiques de la génétique* pp. 461-483.
73. 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.

74. QUIBERONI A., REZAIKI L., EL KAROUI M., BISWAS I., TAILLIEZ P., GRUSS A., QUOT., 2001 - Distinctive features of homologous recombination in an microorganism, *Lactococcus lactis*." *Res Microbiol* .,52 (2001): 131-139.
75. RAYAVARAPU B., TALLAPRAGADA P., 2019 - Evaluation of Potential Probiotic Characters of *Lactobacillus Fermentum*. *Scientific Study Research. Chemistry and Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*, 20(2), 183-197.
76. RILEY M.A., WERTZ J.E., 2002 - Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu Rev Microbiol*. 56:117-137.
77. Rogers L.A., Whittier E.O., 1928 - Limiting factors in lactic fermentation. *J Bacteriol*. 16:211-229.
78. SALMINEN S., WRIGHT A.V. , OUWEHAND A.C., 2004 - *Lactic Acid Bacteria Microbiological and functional aspects* Third edition Taylor & Francis Group. Boca Raton London New York.
79. SALVETTI E., TORRIANI S., FELIS G.E., 2012 - The genus *Lactobacillus*: a taxonomic update. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 4 (4): 217-226.
80. SAVADOGO A., TRAORE A.S., 2011 - La flore microbienne et les propriétés fonctionnelles des yaourts et laits fermentés. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 5(5): 2057-2075.
81. SCHÄGGER H., 2006 - *Nature Protocol*.1 :16-22.
82. SCHÄGGER H., VON JAGOW G., 1987 - Tricine–sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1–100. *Biochem*. 166: 368–379.
83. SCHILLINGER U., GEISEN R., HOLZAPFEL W.H., 1996 - Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends Food Sci. Technol*. 7: 158-64.
84. SCHUHARDT VT., 1964 - Lysostaphin : un nouvel agent bactériolytique pour le staphylocoque *cus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 51:414-421.
85. STILES M. E., W. H. HOLZAPFEL., 1996 - Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int j food Microbiol* .36 (1) :1-29.
86. SVEC P., FRANZ CHARLE M.A.P., 2014 - The genus *Enterococcus*. *Biodeversity and taxonomy*. 340-346.
87. TAGG J. R., DAJANI A. S., WANNAMAKER L. W., 1976 - Bacteriocins of gram positive bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 40: 722-756.

88. TAILLIEZ P., 2004 - Les lactobacilles : propriétés, habitats,rôle physiologique et intérêt en santé humaine. *Antibiotiques*. 6(1): 35–41.
89. THOMAS L.V., CLARKSON M.R., DELVES-BROUGHTON J., 2000 - Nisin. In: Naidu, A.S. (Ed.), *Natural food antimicrobial systems*. CRC Press, Boca-Raton, FL, pp. 463-524.
90. VANDAMME P., POT B., GILLIS M., DEVOS P., KERESTERS K., SWWINGS J., 1996 – Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiol. Rev.* 60 : 407.
91. VOLLENWEIDER L., ZARAZAGA M., SAENZ J., RUIZ-LARREA F., TORRES C., 2000 - Bacteriocin production by lactic acid isolated from rioja red wines. *J. Appl. Microbiol.* 21 :305-314.
92. WHILEY R.A., HARDIE J.M., 2009 - Genus *Streptococcus* Rosenbach 1884, 22AL. In: De Vos, P; Garrity G., Jones D et al .(eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2 nd edn, Vol3. New York: Springer.655-711.
93. ZALAN Z., BARATH A ., HALASZ A., 2005 - Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains. *Food Technol. Biotech.* 43(3): 219- 225.