



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Amar Telidji –Laghouat–
Département Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme de Master académique
Faculté des Sciences
Département de biologie
Spécialité : microbiologie appliquée

Thème
Etude bibliographique des aptitudes technologique et du potentiel probiotique
des bactéries lactiques

Présenté par :

- **Hadjadj Khalifa.**
- **Naouri Belkacem.**

Jury:

Président : Krantar Kamel MAA.....Université Amar Telidji –Laghouat–
Examineur : Gacem mohamed amine MAA..... Université Amar Telidji –Laghouat–
Encadrant: Zerrouki mohamed Hocine MAA..... Université Amar Telidji –Laghouat–

Grade :

2019/2020

Sommaire

Résumé :	8
Liste des figures	11
Listes des tableaux	12
Liste d'abréviations.....	14
I. Introduction	15
II. Généralités sur les bactéries lactiques :	17
II.1. Définition et caractéristiques :	17
II.2. Niches écologiques :	17
III. Classification des bactéries lactiques :	19
III.1. Classification classique :	20
III.2. Classification moderne :	20
IV. Les principaux genres de bactéries lactiques :	23
IV.1. Les genres <i>Lactococcus</i> et <i>Streptococcus</i> :	23
IV.2. Le genre <i>Leuconostoc</i> :	24
IV.3. Le genre <i>Lactobacillus</i> :	25
IV.4. Le genre <i>Bifidobacterium</i> :	28
IV.5. Les genres <i>Pediococcus</i> et <i>Tetragenococcus</i> :	29
V. Métabolisme des bactéries lactiques :	29
V.1. Le métabolisme des sucres :	29
V.2. Le métabolisme des protéines :	31
V.3. Métabolisme du citrate :	33
VI. Génétique des bactéries lactiques :	35
1.7 Identification des bactéries par la biologie moléculaire	36
1.7.1 Méthodes basées sur la PCR (réaction en polymérisation en chaîne)	36
1.7.2 Amplification de régions consensus et séquençage : sous-unité de l'ARN.....	36
ribosomique 16S	36
1.7.2.1 Principe	36
1.7.2.2 Protocole générale.....	37
VII. Intérêts technologiques des bactéries lactiques :	37
VII.1. Activité acidifiante (production d'acide lactique) :	37
VII.2. Activité protéolytique :	37
VII.3. Pouvoir aromatisant et pouvoir gazeux :	39
VII.4. Pouvoir lipolytique :	39
VII.5. Pouvoir texturant :	39
VII.6. Activité bactériostatique :	40
3.1 Aspects généraux de la biopréservation.....	41
La biopréservation	42

Les bactéries lactiques dans la biopréservation	42
1.6 Bactériocines des bactéries lactiques	44
1.6.1 Historique et définition	44
1.6.2 Classification.....	45
1.6.2.1 Classe I :.....	45
1.6.2.2 Classe II :	46
1.6.2.3 Classe III :.....	46
1.6.2.4 Classe IV :.....	46
1.6.3 Production des bactériocines.....	46
1.6.4 Mécanismes d'action des bactériocines	47
1.6.5 Spectre d'activité bactériocinique	48
1.6.6 Le Conditionnement des bactériocines	49
1.6.7.1 Domaine alimentaire	50
1.6.7.2 Domaines de la médecine humaine.....	50
1.6.7.3 Domaine agricole	51
1.7 Identification des bactéries par la biologie moléculaire	51
1.7.1 Méthodes basées sur la PCR (réaction en polymérisation en chaîne)	52
1.7.2 Amplification de régions consensus et séquençage : sous-unité de l'ARN ribosomique 16S	52
1.7.2.1 Principe	52
1.7.2.2 Protocole générale.....	52
Conclusion :	53
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	54



REMERCIEMENTS

Avant tout, je remercie mon Dieu « Allah » le seul et unique le tout puissant, qui me guide, me protège et m'a aidé pour dépasser toutes les difficultés que j'ai rencontrées et m'a donné la force, la volonté et la patience pour finir ce travail malgré tout.

Au terme de ce mémoire, je voudrais remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à sa réalisation. En premier lieu, j'aimerais remercier mon Promoteur, le Dr. Zerrouki Med Hocine. Pour ses conseils, sa gentillesse, sa patience et sa grande disponibilité, qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude et mon plus profond respect.

Dédicaces

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

Je dédie particulièrement. à mes très chers et adorables Parents qui m'ont inculqué toutes les bases de mon savoir, que DIEU me les garde.

Je dédie aussi ce travail à mes frères et sœurs et mes chers frères : Dalal, Ibrahim el Khalil et Nour, Pour leur tendresse infinieJe vous aime à l'infinie.

A tous mes amis, A tous mes collègues étudiants de département de microbiologie.

- Promotion 2020 –

A tous ceux Qui m'ont témoigné leur affection et leur soutien durant mon Coursus universitaire.

Hadjadj Khalifa.

Dédicaces

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

Je dédie particulièrement à mes très chers et adorables Parents qui m'ont inculqué toutes les bases de mon savoir et spécialement à mon père Qu'il repose en paix, je souhaite qu'Allah le Miséricorde.

Je dédie aussi ce travail à ma femme Pour leur tendresse infinie.

Et aussi a mes chers enfants..... Je vous aime à l'infinie.

A tous mes amis, A tous mes collègues étudiants de département de microbiologie.

- Promotion 2020 –

A tous ceux Qui m'ont témoigné leur affection et leur soutien durant mon Coursus universitaire.

Naouri Belkacem .

Résumé :

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes utiles à l'homme lui permettant de fabriquer et de conserver nombre de ses aliments. Cette synthèse a pour objectif de mieux connaître ces bactéries ubiquistes qui sont aptes à se développer sur différents substrats autres que le lait. Les bactéries lactiques sont des **bactéries à Gram positif, anaérobies** partiellement tolérantes à l'oxygène, ne produisant pas en général de spores, se présentant sous formes de coques ou de bâtonnets et capables de fermenter les sucres en acide lactique. On les caractérise aussi par le faible contenu de leur ADN en paires de bases G-C **guanine-cytosine** (< 50 %) sauf pour les **bifidobactéries** qui ont un taux supérieur à 50 % de GC. Elles ont pour habitat de nombreux milieux naturels et accompagnent l'activité humaine en tant que bactéries de la flore commensale des **muqueuses** et de la flore alimentaire.

Les bactéries lactiques présentent des activités métaboliques assez diversifiées et une capacité d'adaptation à différents environnements. Cette diversité est responsable de leur large gamme d'applications à l'échelle industrielle. Dans l'industrie alimentaire, ces microorganismes permettent la conversion d'une grande variété de matières premières, conduisant ainsi à de nombreux produits : les saucissons, les laits fermentés, les fromages, le beurre, les olives fermentés et certains vins. Parmi ces applications, l'industrie laitière est, sans doute, le plus grand utilisateur de ferments lactiques commerciaux. Elles sont également utilisées dans l'industrie chimique (production d'acide lactique), dans le domaine médical (notamment pour le traitement de dysfonctionnements intestinaux) et dans l'industrie des additifs alimentaires (production d'exopolysaccharides).

Les bactéries lactiques permettent, de part leur métabolisme, d'augmenter la durée de conservation d'origine des denrées et leur confèrent une saveur et une texture différente. Elles sont devenues depuis longtemps les principaux candidats probiotiques et bénéficient d'un statut GRAS (Generally Regarded As Safe).

Mots clés: Bactéries lactiques, probiotiques, fermentation lactiques, aptitudes technologiques.

Abstract:

The lactic acid bacteria are useful microorganisms to man enabling it to manufacture and maintain many of its food. This synthesis aims to better know these ubiquitous bacteria that are able to grow on different substrates other than milk. Lactic acid bacteria are Gram positive, anaerobic partially tolerant to oxygen, generally do not produce spores, which is in the form of hulls or sticks capable to ferment and sugars into lactic acid. It also characterizes the low content of their DNA base pairs guanine-cytosine GC (<50%) except for the bifidobacteria that a rate higher than 50% GC. They have many natural environments as habitat and accompanying human activity as bacteria of the commensal flora and flora food.

Lactic acid bacteria exhibit quite diverse metabolic activities and an ability to adapt to different environments. This diversity is responsible for their wide range of industrial scale applications. In the food industry, these microorganisms allow the conversion of a wide variety of raw materials, resulting in many products: sausages, fermented milks, cheeses, butter, fermented olives and some wines. Among these applications, the dairy industry is arguably the largest user of commercial lactic acid bacteria. They are also used in the chemical industry (production of lactic acid), in the medical field (in particular for the treatment of intestinal dysfunctions) and in the food additive industry (production of exopolysaccharides).

Lactic acid bacteria allow, through their metabolism, to increase the original shelf life of foods and give them a different flavor and texture. They have long since become the main candidates for probiotics and enjoy GRAS (Generally Regarded As Safe) status.

Keywords: Lactic acid bacteria, probiotics, lactic fermentation, technological aptitudes

ملخص

البكتيريا اللبنية هي كائنات حية دقيقة مفيدة للإنسان تمكنه من تصنيع وصيانة العديد من احتياجاتها الغذائية . ويهدف هذا العمل لمعرفة أفضل لهذه البكتيريا التي توجد في كل كما انها قادرة على النمو على ركائز مختلفة أخرى غير الحليب .البكتيريا اللبنية هي موجبة الجرام، لاهوائية تحتاج جزئياً إلى الأكسجين، وعادة لا تنتج ابواغ، و هي تكون في شكل كوراة أو العصي قادرة على الهدم السكريات إلى حمض اللاكتيك كما انها تتميز أيضا بنسبة منخفضة من أزواج قاعدة الجوانين السيتوزين $GC < 50\%$ باستثناء البفيدوبكتيريا التي لها معدل أعلى من $50\% GC$ تعيش في بيئات طبيعية كثيرة مصاحب للنشاط البشري و متعايشة معه كما توجد في غذائه.

تعرض بكتيريا حمض اللاكتيك أنشطة أيضا متنوعة تماما وقدرة على التكيف مع بيئات مختلفة. هذا التنوع مسؤول عن مجموعة واسعة من التطبيقات الصناعية في صناعة الأغذية ، تسمح هذه الكائنات الدقيقة بتحويل مجموعة متنوعة من المواد الخام ، مما ينتج عنه العديد من المنتجات: النقانق والحليب المخمر والجبن والزبدة والزيتون المخمر وبعض أنواع النبيذ. من بين هذه التطبيقات ، يمكن القول إن صناعة الألبان هي أكبر مستخدم لبكتيريا حمض اللاكتيك التجارية. كما أنها تستخدم في الصناعة الكيميائية (إنتاج حمض اللاكتيك) ، في المجال الطبي (لا سيما لعلاج الاختلالات المعوية) وفي صناعة المضافات الغذائية (إنتاج عديدات السكاريد الخارجية).

تسمح بكتيريا حمض اللاكتيك ، من خلال عملية التمثيل الغذائي ، بزيادة العمر الافتراضي للأطعمة ومنحها نكهة وملمسا مختلفين. لقد أصبحوا منذ فترة طويلة المرشحين الرئيسيين للبروبيوتيك ويتمتعون بحالة GRAS (تعتبر بشكل عام آمنة).

الكلمات المفتاحية : بكتيريا لبنية، البروبيوتيك، التخمر اللبني

Liste des figures

Figure 1 : Principales voies du métabolisme de glucose par les bactéries lactiques.

Figure 2 : Présente les principales voies de dégradation des protéines du caillé au cours de l'affinage des fromages.

Figure3 : La fermentation du lactose chez les bactéries lactiques : voie Homofermentaire et voie Hétérofermentaire.

Figure 04 : Exemples de bactéries lactiques utilisées en biopréservation.

Figure 05 : Mécanismes d'action des bactériocines.

Figure 06 : Vue d'ensemble des applications potentielles des bactériocines.

Listes des tableaux

Tableau 1 : Les différents genres des bactéries lactiques utilisées dans l'industrie agro-alimentaire.

Tableau 2 : Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques.

Tableau 3 : Caractères de différenciation des espèces de *Lactococcus* sp. et *Streptococcus thermophilus* d'intérêt laitier.

Tableau 4: Les caractères distinctifs des espèces du genre *Leuconostoc*.

**Tableau 5 : Quelques caractères distinctifs des *Lactobacillus*
(-) : réaction négative. (+) : réaction positive.**

Tableau 6 : Quelques exemples de souches appartenant aux trois groupes.

Tableau 07 : Classification des bactériocines

Tableau 8 : Bactériocine produite par des bactéries probiotiques

Liste d'abréviations

E	<i>Escherichia</i>
En	<i>Enterococcus Faecium</i>
L	<i>Lactobacillus</i>
LbC	Bactérie lactique du colostrum
LbL	Bactérie lactique du lait maternel
Lc	<i>Lactococcus</i>
S	<i>Staphylococcus</i>
Sp	Especies non précise
Ssp	Sous espèce
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARNr	Acide Ribonucléique Ribosomique
ATCC	American Type Culture Collection
dNTP	Desoxynucléotides
DO	Densité Optique
EDTA	Acide Ethylene Diamine Tetra Acétique
G+C	Guanine+Cytosine
GRAS	Generally Regarded As Safe
MRS	Man Rogosa et sharp
Pb	Paire de base
PCR	Polymerase Chain Réaction
TBE	Tris borate- EDTA
TES	Tris EDTA-Saccharose
UFC	Unité formant Colonie
UV	Ultra- Violet

I. Introduction

Depuis des milliers d'années, les bactéries lactiques sont utilisées pour fabriquer divers produits alimentaires fermentés, y compris des produits laitiers. Les produits fermentés renferment plusieurs souches, de genres et d'espèces différents, ayant pour point commun la production d'acide lactique.

De part leur métabolisme, les bactéries lactiques permettent d'allonger la durée de conservation des denrées alimentaires, et leur confèrent une saveur et une texture différentes. Elles peuvent aussi apporter des bienfaits au niveau santé et nutrition (Desmazeaud, 1992)

Vu leur importance économique et alimentaire, les bactéries lactiques ont reçu l'attention nécessaire de la technologie industrielle notamment les industries agro-alimentaires. La recherche se dirige vers la sélection et le développement de nouvelles souches de bactéries lactiques pour la production des ferments industriels dont le métabolisme rendra le produit fini encore plus stable et attractif (Cleveland et *al.*, 2001 ; Drouault et Corthier, 2001).

L'étude de l'acidification est un élément principal pris en considération par les industriels fromagers, pour le choix des souches lactiques qui devront servir à la fabrication des fromages. D'autres caractéristiques d'une grande importance technologique devront également intervenir dans le choix de ces micro-organismes, en particulier l'aptitude à la protéolyse qui est l'une des caractéristiques intervenant lors de l'affinage des fromages (Desmazeaud, 1992).

Les bactéries lactiques doivent être sélectionnées essentiellement selon leurs aptitudes technologiques (capacité d'acidification, aromatisation, production de CO₂, protéolyse, résistance aux phages, production de bactériocines et production de dextrans) dans de nombreux aliments fermentés (De Roissart, 1986 ; Diviès et *al.*, 1994).

Les bactéries lactiques interviennent dans de nombreuses transformations du lait (crème maturée, laits fermentés comme le yaourt, fromages frais et affinés), mais également dans la vinification (fermentation malolactique), la fabrication des salaisons, la fermentation des végétaux (choucroute et ensilages) et en boulangerie traditionnelle. Les technologies laitières représentent toutefois le principal secteur d'application des bactéries lactiques (Papamanoli et *al.*, 2003).

Les bactéries lactiques présentent un caractère déterminant pour leur utilisation : un important polymorphisme, qui se traduit par l'existence au sein des espèces de nombreuses souches possédant des propriétés technologiques différentes, et par l'instabilité des souches elles-mêmes. Cette variabilité, due à une organisation particulière du matériel génétique des bactéries, accroît la gamme des utilisations, mais aussi les risques d'instabilité technologique. (François *et al.*, 2007).

L'utilisation des procédés de fermentation a augmenté durant ces dernières années et inclue maintenant beaucoup de types d'alimentation que ce soit pour les humains ou les animaux (Ross *et al.*, 1999; Schnürer et Magnusson, 2005). L'utilisation des ferments, d'une part, a été énormément positive en ce qui concerne la qualité du produit, mais d'autre part, elle a diminué la diversité des produits laitiers fermentés (Cogan, 1987; Fitzsimmons et *al.*, 1999; Scannell et *al.*, 2001; Lee et *al.*, 2006).

Notre synthèse s'inscrit dans le cadre d'une contribution à l'enrichissement des connaissances sur ce groupe de microorganismes qui est un acteur majeur de l'industrie agroalimentaire. En annexe à ce document on a préféré mettre les techniques de culture et d'identification de ces bactéries.

II. Généralités sur les bactéries lactiques :

II.1. Définition et caractéristiques :

Le groupe des bactéries lactiques englobe un ensemble de micro-organismes morphologiquement hétérogène caractérisées par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique D(-), L(+), DL. Selon (Orla-Jensen, 1919), La fermentation est dite homolactique si l'acide lactique est pratiquement le seul produit formé et hétérolactique si d'autres composés sont aussi présents (acide acétique, éthanol, CO₂, etc...). D'autre part les bactéries sont dites : homofermentaires si elles empruntent dans le métabolisme glucidique la voie d'Embden Meyerhof Parnas(Glycolyse) de telle sorte que l'acide lactique soit le seul produit final, par contre, si elles réalisent la voie des Pentoses phosphate elles sont donc hétérofermentaires (Leveauet *al.*, 1991). Les bactéries lactiques présentent des caractéristiques communes qui expliquent leur regroupement.

Ce sont des bactéries Gram (+), généralement immobiles, non sporulantes, catalase et oxydase négatives et généralement nitrate réductase négative. Anaérobies facultatives, micro-aérophiles, capables de fermentation en aérobiose comme en anaérobiose, sont aussi dépourvues de cytochromes et inaptes à toute respiration aérobie ou anaérobie. Toute leur énergie vient de la fermentation. Chimio-organotrophes, poly-auxotrophes pour divers acides aminés, bases nucléiques, vitamines, acides gras. Ce qui explique leur faible capacité de biosynthèse. Alors que la majorité des souches se développent à pH 4,0-4,5, certaines sont en activité à pH 9,6 et d'autres à pH 3,2 (Novel, 1993 ; Jozala et *al.*, 2005).

II.2. Niches écologiques :

Bien qu'elles servent à de nombreux procédés concernant l'industrie laitière et agro-alimentaire, les bactéries lactiques habitent de nombreux milieux qui peuvent être probablement leur réservoir naturel (Desmazeaud, 1992;Novel, 1993). Les bactéries lactiques du lait proviennent de l'organisme de l'animal producteur (vaches, brebis, chèvres et chamelles) ou des plantes. De nombreuses souches de *Lactococcus*, *Lactobacillus* et *Leuconostoc* ont été isolées à partir de différents laits de vaches, brebis et chèvres (Cherigueneetal., 2006 ; Chougrani et *al.*, 2006 ; Rouissat et Bensoltane, 2006).

Les espèces des genres *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc*, peuvent être isolées chez l'homme, la peau et le poil des animaux, les oiseaux, des matières fécales, des poussières, de l'ensilage du foin, des grains et des ustensiles de domiciles et industriels en quantités considérable (Petransxiene et Lapied, 1981; Desmazeaud, 1992).

Les lactocoques comme les Streptocoques du groupe N non pathogènes peuvent être isolées du lait et des végétaux. *Lactococcus lactis subsp. lactis* est facilement isolée du lait cru et des végétaux par contre *Lactococcus lactis subsp. cremoris* est exclusivement isolée du lait (Guiraud et Galzy, 1980).

Les *Leuconostocs* habitent plusieurs milieux : Lait et produits laitiers, fruits et légumes en particulier la betterave d'où leur ancien nom *Betacoccus* (Leveau et al., 1991). On les isole même des produits de panification, des solutions visqueuses dans les sucreries tandis que l'espèce *Oenococcus oeni* ne peut être isolée que du vin (Larpenetal., 1990; Novel, 1993).

Les lactobacilles sont, quantitativement, les plus importantes du groupe des bactéries lactiques. Elles sont très hétérogènes et ces diverses espèces présentent des caractères phénotypique et génotypique variés. Cette variété se reflète dans le pourcentage de G+C qui peut aller de 32 à 53%. (Falsenetal., 1999).

Les espèces mésophiles qui ont un large spectre de fermentation sont présentes dans le lait, laits fermentés, fromages, végétaux fermentés, on les isole également du vin, de la bière, des produits de panification et mêmes des viandes fraîches ou fermentées (Petransxiene et Lapied, 1981; Desmazeaud, 1992). Par contre on remarque que les espèces thermophiles qui sont caractérisées par un spectre d'acidification étroit peuvent être obtenues des laits fermentés, yaourt, lait traité par la chaleur et certains fromages à des températures dépassant 40°C (Novel, 1993).

Lactobacillus acidophilus se trouve dans l'intestin de l'homme et des animaux, par sa nature, elle résiste à des pH très bas, ainsi qu'aux sels biliaries. (Desmazeaud, 1992). Enfin les espèces du genre *Pediococcus* ne peuvent être isolée qu'à partir des végétaux et rarement des vins, bières et parfois des laits fermentés (Desmazeaud, 1992; Novel, 1993).

III. Classification des bactéries lactiques :

Groupe hétérogène, les bactéries lactiques sont représentées par plusieurs genres d'importance différente. Deux types de morphologies se distinguent (Tableau 1) :

1/ Les cocci (0,5 à 1,5 μm de diamètre) qui comprennent les Leuconostocs, les Lactocoques et les pedicoques (De Roissart, 1986).

2/ Les bacilles (0,5 à 2 μm de diamètre et 1,5 à 10 μm de longueur) comprenant les lactobacilles.

Tableau 1 : Les différents genres des bactéries lactiques utilisées dans l'industrie agro-alimentaire (Novel, 1993).

	Cellules		Fermentation	ADN GC%
	Formes	arrangement		
<i>Streptococcus</i>	Coque	chaînes	homolactique	34-46
<i>Leuconostoc</i>	Coque	chaînes	hétérolactique	36-43
<i>Pediococcus</i>	Coque	tétrades	homolactique	34-42
<i>Lactobacillus</i>	Bacille	chaînes	homo- hétéro lactique	32-53
<i>Bifidobacterium</i>	Variée	variée	acétique et lactique	55-67

Ils se distinguent en plus par leur type de fermentation qui peut être un critère de classification. On trouve :

1/ Les homofermentaires, pour lesquels l'acide lactique représente 90% du lactose fermenté. Tous les lactocoques et une partie des lactobacilles ainsi que tous les pedicoques peuvent être rattachés à ce groupe.

2/ Les hétérofermentaires, qui fermentent le lactose en acide lactique 50 % avec production d'une importante quantité de CO_2 , les leuconostocs et l'autre partie des lactobacilles appartiennent à ce groupe (Tableau 1).

Il y a aussi une différence si on considère le critère de la température optimale de croissance comme un élément de distinction on aura alors :

1/ Les bactéries mésophiles, ayant une croissance optimale aux températures voisines de 20°C et 30°C.

2/ Les bactéries thermophiles, avec une croissance optimale aux températures voisines de 40°C à 45°C (Bissonnette et *al.*, 2000).

Cette classification peut être mieux affinée si on considère le pourcentage en base (GC%) de l'ADN des espèces qui permet de connaître l'homogénéité des genres. Le pourcentage du GC% de l'ADN montre une composition assez proche chez les genres *Streptococcus* (34-36%), *Leuconostoc* (36-43%) et *Pediococcus* (34-42%) (Farrow et Collins, 1984 ; Schleifer *et al.*, 1985), par contre le genre *Lactobacillus* est caractérisé par l'hétérogénéité de ces espèces (32-53%). Chez les *Bifidobacterium* le pourcentage de GC% varie de 55 à 67% (Scardovi, 1986).

➤ On distingue deux types de classification :

III.1. Classification classique :

Elle s'appuie sur les caractères phénotypiques distinctifs de l'espèce et du genre; la première classification était donc basée sur la morphologie, la température de croissance, le mode de fermentation du glucose et la forme de l'acide lactique produit (Orla Jensen, 1919).

En 1957, le Bergey's Manual, a regroupé les bactéries lactiques dans la famille des *Lactobacteriaceae*, mais cette classification a été remise en question et totalement simplifiée (Desmazeaud, 1992).

III.2. Classification moderne :

Cette classification est mieux affinée car elle s'appuie principalement sur les techniques d'électrophorèse des protéines et des acides nucléiques, la définition du pourcentage GC de l'ADN, ce qui permet de définir une souche bactérienne du point de vue de la taxonomie moléculaire, et de connaître l'homogénéité des genres. La taxonomie actuelle investie le progrès de la génétique (hybridation ADN-ADN, ADN-ARN), de l'écologie (découverte des bactéries de milieux externes), elle inclue également les techniques modernes de séquençage d'ADN, de micro galeries d'identification, des banques de données informatisées (Bugnicourt, 1995).

Les bactéries lactiques sont un vaste ensemble des microorganismes procaryotes qui se rattachent à deux filiations généalogiques, ou phylum :

Le phylum de *Clostridium*, dont l'ADN des chromosomes contient un pourcentage de G+C inférieur à 50%. Ce phylum comprend le groupe des bactéries lactiques au sens strict qu'on rencontre dans les aliments, soit en forme de coque (*Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* et *Enterococcus*), soit en forme de bâtonnet (*Lactobacillus* et *Carnobacterium*).

Le phylum des *Actinomycètes*, dont l'ADN des chromosomes contient un pourcentage de G+C supérieur à 50%. Ce phylum comprend des genres apparentés, qu'on range souvent au sens large (*Bifidobacterium*, *Propionobacterium*).

Cependant les genres *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, et *Streptococcus*, dont le G+C% de l'ADN est inférieur à 50% peuvent être regroupés dans la branche des *Clostridium* avec *Bacillus* et *Clostridium* est séparé de la branche des actinomycétales au G+C supérieur à 50% et comprenant *Propionobacterium* et *Bifidobacterium* (Kandler et Weiss, 1986 ; Stackebrandt et Goebel, 1994 ; Stackebrandt *et al.*, 2002).

Le rassemblement de ces 5 genres dans un même groupe est confirmé par la taxonomie moléculaire ; l'analyse de la séquence nucléotidique de leur ARN ribosomique (ARN16S) permet de réunir dans un même grand groupe phylogénétique les genres : *Lactobacillus*-*Pediococcus*-*Leuconostoc*-*Streptococcus*-*Bacillus*-*Clostridium*-*Propionobacterium*-*Bifidobacterium* (Scardovi, 1986).

Le tableau 2 regroupe les principales caractéristiques des 12 genres les plus étudiés des bactéries lactiques : *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus*, *Weissella*. Les bactéries du genre *Bifidobacterium* ne sont pas considérées comme des bactéries lactiques typiques, mais leur usage est très répandu en industrie laitière (Isolauri *et al.*, 2001).

Tableau 2 : Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques (Dellaglio et al., 1994).

Genre	Morphologie	Fermentation	T° Opt	Habitats Principaux
<i>Lactobacillus</i>	Bacilles	Homofermentaires ou Hétérofermentaires	Thermophiles ou Mésophiles	Homme Produits laitiers, carnés, végétaux ...
<i>Carnobacterium</i>	Bacilles	Hétérofermentaires	Psychrotrophes peu acidotolérants	Produits carnés, poissons, produits laitiers
<i>Lactococcus</i>	Coques	Homofermentaires	Mésophiles	Produits laitiers, végétaux
<i>Streptococcus</i>	Coques	Homofermentaires	Mésophiles ou Thermophiles	Produits laitiers
<i>Enterococcus</i>	Coques	Homofermentaires	Mésophiles	Intestin de l'homme et des animaux, produits laitiers
<i>Vagococcus</i>	Coques mobiles	Homofermentaires	Mésophiles	
<i>Pediococcus</i>	Coques en tétrades	Homofermentaires	Mésophiles	Bière, produits végétaux, saucissons
<i>Tetragenococcus</i>	Coques en tétrades	Homofermentaires	Mésophiles	Saumures
<i>Leuconostoc</i>	Coques	Hétérofermentaires	Mésophiles	Produits végétaux, produits laitiers
<i>Oenococcus</i>	Coques	Hétérofermentaires	Mésophiles	Vin
<i>Bifidobacterium</i>	Forme en Y (Bifid)	Acide acétique et lactique	Mésophiles	Intestin de l'homme et des animaux
<i>Weissella</i>	Coques	Hétérofermentaires	Mésophiles	Produite végétaux, produits laitiers

T° Opt : température optimale de développement

IV. Les principaux genres de bactéries lactiques :

IV.1. Les genres *Lactococcus* et *Streptococcus* :

Avant, les bactéries du genre *Lactococcus* été appelées les streptocoques mésophiles ou du groupe N (Tableau 3). Elles sont morphologiquement sphériques (cocci) de 0,5 à 1µm de diamètre généralement groupées en chaînes parfois en paires (diplocoque).

Tableau 3 : Caractères de différenciation des espèces de *Lactococcus* sp. et *Streptococcus thermophilus* d'intérêt laitier (Sandine, 1988).

Caractères	<i>Lactococcus Lactis</i>		<i>Ssp</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Streptocoques</i>
Espèces	<i>Lactis</i>	<i>cremoris</i>	<i>Diacetylactis</i>	<i>raffinolactis</i>	<i>thermophilus</i>
Culture 10°C	+	+	+	+	-
Culture 40°C	+	+	+	-	+
Culture 45°C	-	-	-	-	+
Lait 1% BM	+	+	+	ND	-
Lait 0,3% BM α	+	+	+	-	-
NaCl 2,5%	+	+	+	+	+
NaCl 4%	+	+	+	-	-
NaCl 6,5%	V	-	V	-	-
Réductase	+	+	+	+	-
Citratase	-	-	+	ND	-
Acétoïne	-	-	+	ND	-
Arginine	+	-	+	-	-
Hémolyse	γ	γ	γ	γ	A
Groupe sérologique	N	N	N	N	-

(+) = réaction positive, (-) = réaction négative, v = variable, ND = non déterminé;

Le genre *Lactococcus* est formé de bactéries dont les cellules, en forme de coques, sont associées par paires ou en chaînettes de longueur variable. Ce sont des bactéries homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique L (+). Ces bactéries sont thermosensibles et ne peuvent pas croître en présence de 6,5% de NaCl ou à pH 9,6. Leur température optimale de croissance s'étend de 25 à 35°C respectivement pour les souches de *Lc. cremoris* et *Lc. lactis*. Les *Lactococcus* sont capables de croître à 10°C mais pas à une température supérieure à 40°C (Dellaglio et al., 1994).

Par contre le genre *Streptococcus* comprend essentiellement des espèces d'origine humaine ou animale dont certaines sont pathogènes comme *S.pyogenes* et *S.agalactiae* d'autres sont impliquées dans la formation de la plaque dentaire (*S. mutans*). L'espèce thermophile *Streptococcus thermophilus* se différencie par son habitat (lait et produits laitiers), et son caractère non pathogène. Du fait de ses propriétés technologiques, c'est la seule espèce considérée comme un streptocoque lactique (Carr *et al.*, 2002).

IV.2. Le genre *Leuconostoc* :

La famille des *leuconostocaceae*, contient des coques ovoïdes, pouvant être allongés ou elliptiques. Ce sont des cellules sphériques qui se disposent en paire ou en chaîne, elles sont caractérisées par un métabolisme hétérofermentaire en convertissant le glucose en D-lactate et éthanol ou en acide acétique par la voie de transcétolase, elles sont incapables de dégrader l'arginine ce qui les distingue des lactobacilles hétérofermentaires (Gonzalez *et al.*, 2000).

On range habituellement les leuconostocs dans les anaérobies facultatifs, mais certains les considèrent comme des anaérobies aérotolérants. Ils sont exigeants et présentent souvent une auxotrophie pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels minéraux et les glucides (Dellaglio *et al.*, 1994).

Ce genre comprend les espèces suivantes : *Ln. mesenteroides* avec ces sous espèces *mesenteroides cremoris* et *dextranicum* et *Ln. lactis* et *Ln. pseudomesenteroides* et *Ln. Paramesenteroides* (Collins *et al.*, 1993). Les principaux critères proposés pour la différenciation des espèces et sous espèces reposent sur quelques caractères phénotypiques présentés par Garvie, (1986) dans le Bergey's Manual (Tableau 4).

Tableau 4: Les caractères distinctifs des espèces du genre *Leuconostoc* (Garvie, 1986).

Caractères	1	2	3	4	5	6
Production d'acide a partir de :						
D-xylose	+	v	-	v	-	-
Arabinose	+	-	-	v	-	v
Cellulose	v	v	-	v	-	v
Fructose	+	+	-	+	+	+
Lactose	v	v	v	v	v	-
Saccharose	+	+	-	+	+	-
Tréhalose	+	+	-	+	-	+
Hydrolyse de l'esculine	v	+	-	v	-	+
Formation de dextrans	+	+	-	-	-	-
Croissance à pH 4,8	-	-	-	v	-	+
Croissance éthanol 10 %	-	-	-	-	-	+
Acétoïne (Citrates)	-	-	+	-	-	-
G + C %	39	37	38	39	44	39
G-6 PDH (NAD)	+	+	+	+	+	-
Besoin TJF	-	-	-	-	-	+

(1) *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ; (2) *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, (3) *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* ; (4) *Leuconostoc paramesenteroides* ; (5) *Leuconostoc lactis* ; (6) *Leuconostoc oenos* ; (v) Caractère variable ; (+)Caractère positive ; (-) Caractère négative ; G-6 -PDH = Glucose 6 Phosphate dehydrogénase ; TJF = Tomatojuice factor (Glucopanthoténate).

IV.3. Le genre *Lactobacillus* :

Il regroupe de nombreuses espèces dont l'hétérogénéité est illustrée par la variation du G + C % : 32 à 53 %. Il s'agit des bacilles Gram (+) aéro-anaérobies facultatifs, sont des cellules souvent longues et étroites (0,5-1,2 µm à 1-10 µm), certaines espèces apparaissent courtes et larges, ce qui leur donne un aspect cocobacilles (Kandler et Weiss, 1986), elles sont pour la plus part immobiles, toute fois certains espèces peuvent présenter une mobilité par ciliature piliotriches (Bourgeois et Leveau, 1991).

Ce sont des souches généralement anaérobies facultatives, c'est à dire qu'elles poussent sous une atmosphère pauvre en oxygène et par conséquent leur métabolisme est fermentaire; quelques espèces sont aéro-tolérantes et peuvent utiliser l'oxygène à l'aide d'enzymes (flavoprotéine oxydase), alors que d'autres sont strictement anaérobies (Kandler et Weiss, 1986). Leur croissance est optimale pour une température de 30 à 40 °C et à un pH de 5,5-5,8. Cependant d'une manière générale, elles peuvent se développer à un pH inférieur à 5,0 et sur une gamme de température allant de 5–53 °C (Hofvendahl et Hahn-Hägerdal, 2000).

Le tableau 5 présente quelques caractères distinctifs des espèces du genre

Espèces \ Croissance	à 15°c	à 45°c.	Lactose.	sacc.	glucose	ribose	xylose	ADH
<i>Lb.delbrueckiisspdelbrueckii</i>	-	+	-	+	-	-	-	±
<i>Lb.delbrueckiisspbulgaricus</i>	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Lb. delbrueckiissplactis</i>	-	+	+	+	-	-	-	±
<i>Lb. acidophilus</i>	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>Lb. Gasseri</i>	-	+	±	+	-	-	-	-
<i>Lb. crispatus</i>	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>Lb. helveticus</i>	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Lb. plantarum</i>	+	-	+	+	+	+	±	-
<i>Lb. caseisspcasei</i>	+	-	+	±	+	+	-	-
<i>Lb.caseissppseudoplantarum</i>	+	-	+	+	+	+	-	-
<i>Lb. caseissptolerans</i>	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Lb. curvatus</i>	+	-	±	+	+	+	-	-
<i>Lb. Brevis</i>	+	-	±	±	+	+	±	+
<i>Lb. fermentum</i>	-	+	+	-	+	+	±	+
<i>Lb. Kefir</i>	+	-	+	+	+	+	-	+
<i>Lb. Confusus</i>	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>Lb. viridescens</i>	+	-	-	±	-	-	-	-

Tableau 5 : Quelques caractères distinctifs des *Lactobacillus* (Leveau et al., 1991).

(-) : réaction négative. (+) : réaction positive.(±) réaction tardive. *Lb.:*

Lactobacillus

De plus, ces microorganismes ont des besoins nutritifs complexes ce qui rend leur culture difficile et ces besoins vont varier d'une espèce à une autre (Rogosa et *al.*, 1961; Charalampopoulos et *al.*, 2002). En effet, les bactéries lactiques sont auxotrophes pour de nombreux facteurs de croissance (Dellaglio et *al.*, 1994 ; Fitzpatrick et O'Keeffe, 2001) comme ; les acides aminés, les peptides, les vitamines, les dérivés d'acides nucléiques, les sels minéraux, les esters d'acides gras et les hydrates de carbone.

En 1919, Orla-Jensen a proposé de diviser le genre en trois sous-genres : "*Thermobacterium*", "*Streptobacterium*" et "*Betabacterium*". Cette nomenclature n'a pas été validée et retenue par les Approved Lists of Bacterial Names, et par conséquent elle n'a pas de statut dans la nomenclature.

La classification de Orla-Jensen ne correspondait à aucune réalité taxonomique toutefois, elle est toujours utilisée en pratique même si les noms des sous-genres sont remplacés par des qualificatifs illustrant les caractéristiques de la fermentation.

Ce genre comprend 167 espèces et 27 sous espèces selon la nouvelle classification du Bergey's Manual dont la plupart sont définies par Orla -Jensen, 1919 (Euzéby, 1997) On distingue trois groupes classés en fonction de leurs caractéristiques fermentaires (Kandler et Weiss, 1986 ; Bustos et *al.*, 2005) (tableau 6).

Groupe 1: Les Lactobacilles homofermentaires stricts: (ancien sous-genre : *Thermobacterium*) qui utilisent le glucose grâce à la voie homofermentaire d'Embden-Meyerhof-Parnas. Leur seul produit final étant l'acide lactique (D(-), L(+)) ou DL. Ils ne métabolisent pas les pentoses et ne dégagent pas de CO₂ lors de la fermentation du glucose ou du gluconate. La production en acide lactique est supérieure à 85% à partir du glucose.

Groupe 2: Les Lactobacilles hétérofermentaires facultatifs: (ancien sous-genre : *Streptobacterium*) peuvent changer de voie en fonction du substrat. Ils métabolisent le glucose en acide lactique grâce à la voie homofermentaire d'Embden-Meyerhof-Parnas et dégradent les pentoses par la voie hétérofermentaire des pentoses phosphate. Ils ne produisent pas de CO₂ lors de la fermentation du glucose, mais ils en produisent lors de la fermentation du gluconate (Hofvendahl et Hahn-Hägerdal, 2000).

Groupe 3: Les Lactobacilles hétérofermentaires stricts: (ancien sous-genre : *Betabacterium*) qui fermentent le glucose en acide lactique, CO₂ et acide acétique ou éthanol via la voie hétérofermentaire de la 6-phosphogluconate déshydrogénase/phosphocétolase et qui dégradent les pentoses en acide acétique et en acide lactique via la voie hétérofermentative de la glyceraldéhyde-3-phosphate/pyruvate kinase/lactate déshydrogénase.

Ces bactéries produisent du CO₂ lors de la fermentation du glucose et du gluconate. La production en acide lactique est d'environ 50% avec des quantités importantes en acide acétique, éthanol et CO₂.

Tableau 6 : Quelques exemples de souches appartenant aux trois groupes (Salminen et al., 1998).

	Groupe I: Homofermentaires Obligatoires	Groupe II: Hétérofermentaires facultatifs	Groupe III: Hétérofermentaires Obligatoires
Souches	<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. delbrueckii</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. Salivarius</i>	<i>Lb. casei</i> <i>Lb. curvatus</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. sake</i>	<i>Lb. brevis</i> <i>Lb. buchneri</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. Reuteri</i>

IV.4. Le genre *Bifidobacterium* :

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

IV.5. Les genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus* :

Les *Pediococcus* sont des coques homofermentaires dont la particularité est le regroupement entérotré. Ils sont mésophiles, le plus souvent incapable d'utiliser le lactose, et leur développement nécessite la présence de divers facteurs de croissance. Certaines espèces se distinguent par leur capacité à se développer à des teneurs en sels très élevées, comme *Pediococcus halophilus*, renommé *Tetragenococcus halophilus* et *Tetragenococcus muriaticus* qui tolère jusqu'à 18% de NaCl (Pilet et al., 2005).

Les espèces de *Tetragenococcus* ont un rôle crucial dans la fabrication des produits alimentaires à concentration élevée en sel comme les sauces de soja, alors que les *Pediococcus* sont parfois utilisés comme levains lactiques pour les charcuteries (Guiraud et Rosec, 2004 ; Tosukhowong et al., 2005).

V. Métabolisme des bactéries lactiques :

V.1. Le métabolisme des sucres :

Les bactéries lactiques nécessitent une source d'hydrate de carbone fermentescible pour la production d'énergie cellulaire (ATP) et leur croissance. Le lactose présent dans le lait est un disaccharide composé de glucose et de galactose, atteint des concentrations de 4 à 5%. La Figure 1 présente les principales voies de la glycolyse chez ces bactéries.

Chez les lactocoques, le transport membranaire du lactose et du glucose est assuré par le système phosphotransférase-phosphoenol pyruvate dépendant (système PEP-PTS). Le transport du galactose est effectué par le système PEP-PTS et une perméase d'affinité élevée. Suite à leur transport dans la cellule, les composés glucidiques libres ou modifiés sont catabolisés selon 3 voies; la voie glycolytique principale de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), la voie du D-tagatose-6-phosphate ou la voie de Leloir (Desmazeaud, 1992).

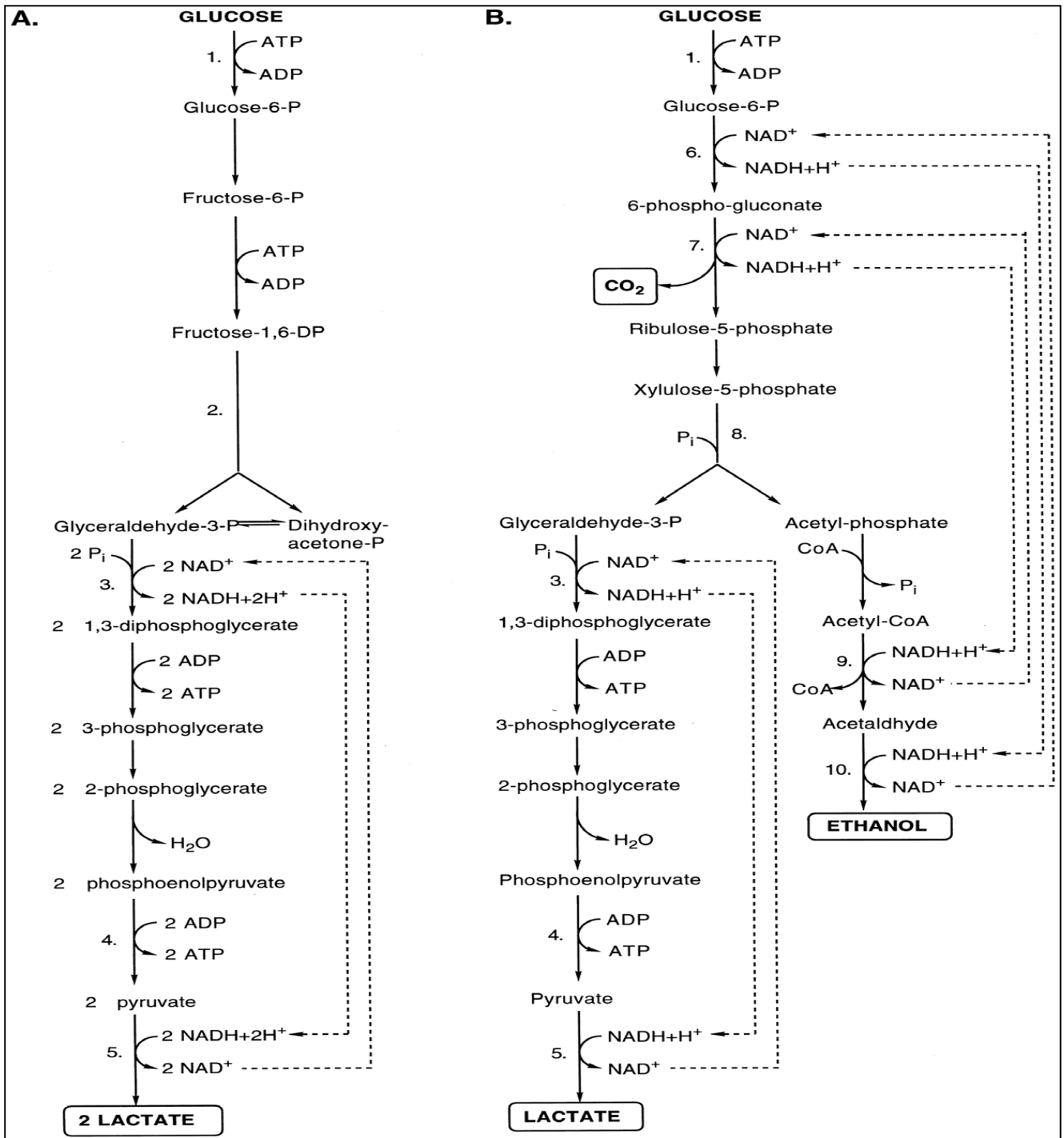


Figure 1 :Principales voies du métabolisme de glucose par les bactéries lactiques.

(A) voie homofermentaire (B) voie hétérofermentaire(Thompson et Collins, 1989).

Les lactocoques utilisent la voie EMP dans la dernière étape de la glycolyse et convertissent le pyruvate en acide lactique. Le métabolisme des sucres est soumis à une régulation par des mécanismes de répression et de rétro inhibition. Le co-métabolisme du citrate peut être observé chez certaines espèces lors de la fermentation des sucres (Schmitt *et al.*, 1990).

En technologie laitière, l'acidification lactique joue de multiples rôles : elle participe à la coagulation du lait, active la synérèse du caillé et la solubilisation du calcium micellaire qui ont une influence déterminante sur la texture des fromages.

Elle contribue aussi aux qualités organoleptiques des produits fermentés et inhibe la croissance des microorganismes nuisibles. Selon la variété de fromage et la flore présente, les produits issus de la glycolyse peuvent être métabolisés selon différentes voies pour la formation de composés aromatiques variés (Zhennai, 2000).

V.2. Le métabolisme des protéines :

Les enzymes impliquées dans la dégradation des caséines du lait durant la maturation incluent la présure, les protéases indigènes du lait (la plasmine) et les enzymes du ferment et de la flore secondaire (Lane et Fox, 1996). La protéolyse est considérée comme étant l'événement biochimique le plus important durant la maturation fromagère.

L'incapacité des bactéries lactiques à synthétiser les acides aminés nécessaires à la synthèse protéique nécessite un fonctionnement actif de leur système protéolytique dans les environnements où les protéines constituent la principale source d'azote (Law et Haandrikman, 1997). Ces systèmes sont complexes de part le nombre et la nature des protéases et peptidases présentes, mais également de part leur localisation cellulaire (Juillard *et al.*, 1996).

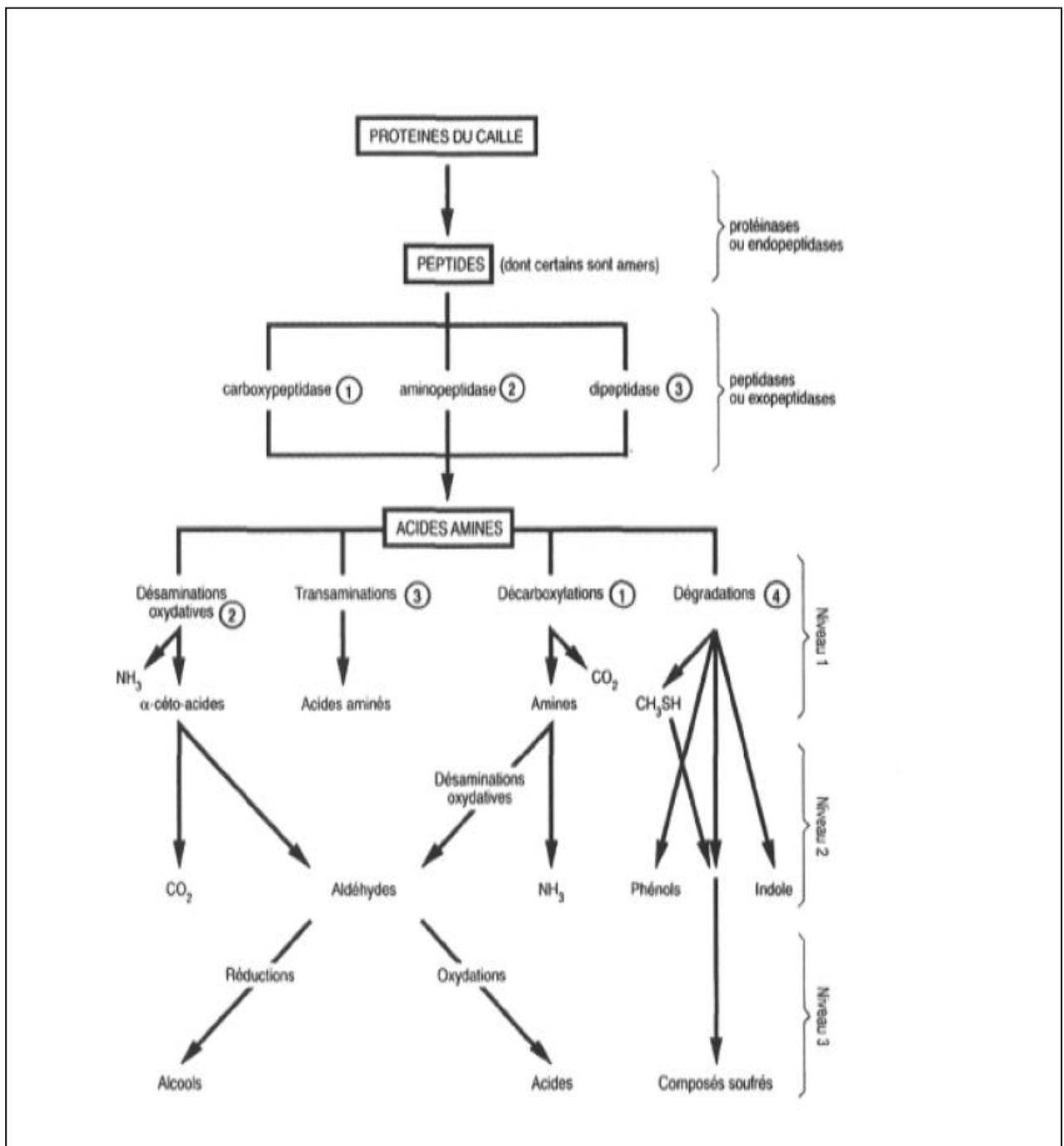


Figure 2 : Présente les principales voies de dégradation des protéines du caillé au cours de l'affinage des fromages (Juillard et al., 1996).

Le système protéolytique des bactéries lactiques est composé de protéases associées à la paroi cellulaire, qui catalysent l'hydrolyse de protéines en peptides contenant de 7 à 16 résidus aminés (Law et Haandrikman, 1997). Ces peptides sont ensuite dégradés par des endopeptidases ou exopeptidases en unités transportables d'acides aminés et de petits peptides. Des études comparatives effectuées sur la protéolyse du cheddar fait avec ou sans ferments lactiques ont démontré l'importance de ces bactéries pour la libération de petits peptides et d'acides aminés libres durant la maturation fromagère (Lane et Fox, 1996). Les acides aminés libres contribuent directement ou comme composés précurseurs d'arômes. Le facteur limitant la production de composés aromatiques serait relié à la capacité bactérienne de conversion des acides aminés en ces composés, caractéristique variable selon les souches. Les voies cataboliques responsables de cette conversion sont principalement les voies initiées par les réactions d'élimination et de transamination impliquant une quantité variable d'enzymes : lyases, décarboxylases, désaminases et transaminases (Topisirovic *et al.*, 2006).

V.3. Métabolisme du citrate :

Dans les produits laitiers, l'acide citrique est considéré comme le précurseur principal des arômes, ainsi la formation de l'acétate, de l'acétoïne et de diacétyl est attribué au catabolisme de cet acide par les bactéries lactiques (Diviès, 1991).

Le mécanisme de production du diacétyl à partir du citrate par les bactéries lactiques mésophiles tels *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* et *Leuconostoc lactis* a été largement étudié par (Cogan, 1975 ; Diviès, 1991 et Hugenholtz, 1993) (Figure 3).

La première étape du métabolisme du citrate est sa pénétration à l'intérieur de la cellule par une citrate permease qui présente une bonne activité à pH 5 chez

Lactococcus lactis subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. Le citrate intérieur est hydrolysé par une citrate lyase en acétate et en oxaloacétate cet enzyme est constitutif chez

Lactococcus lactis subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* et elle est inductif chez *Leuconostoc* (Bekal et al., 1998). Par la suite, l'oxaloacétate est converti en pyruvate et en acétaldéhyde thiamine pyrophosphate avec libération d'une molécule de CO₂

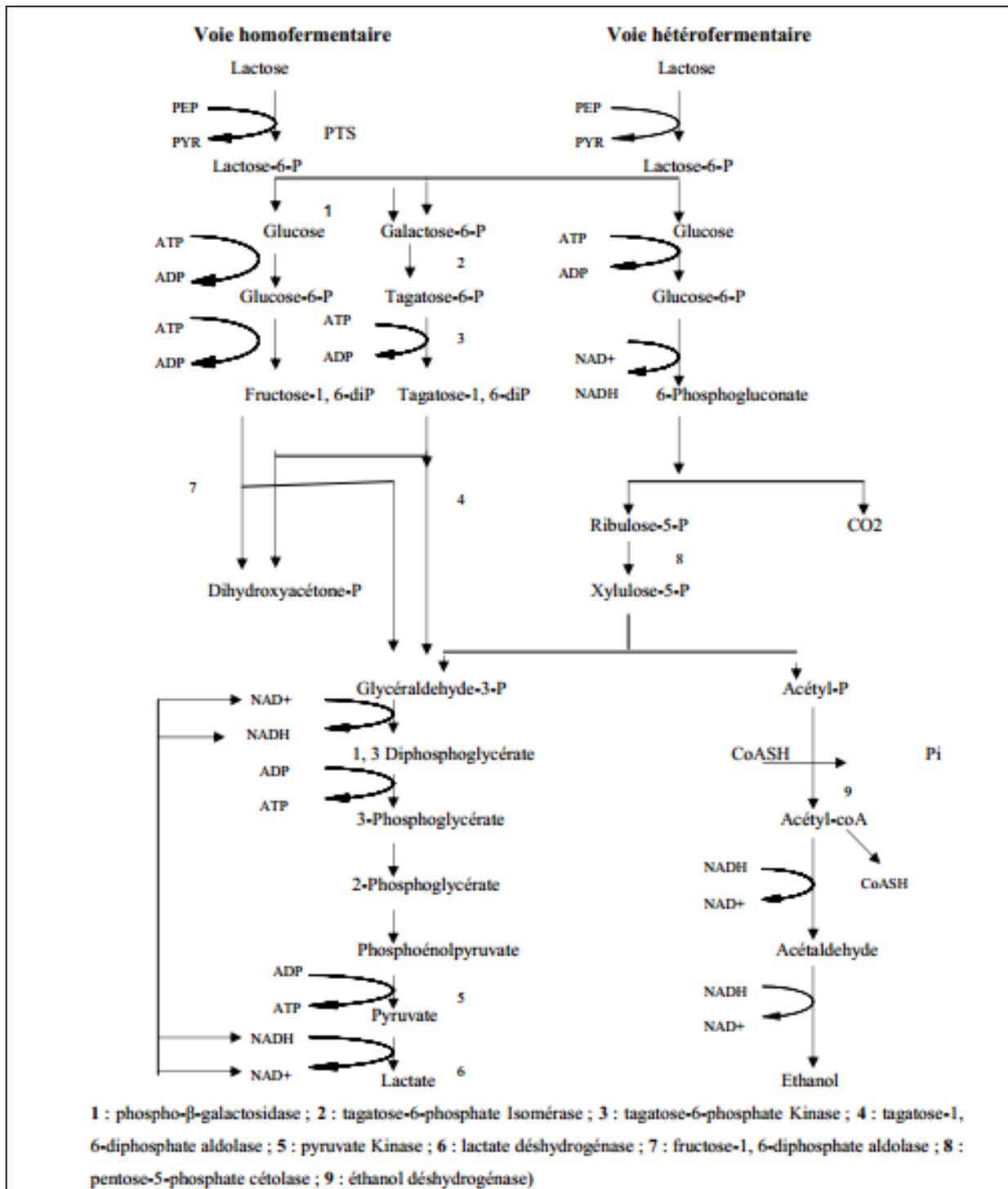


Figure3 :La fermentation du lactose chez les bactéries lactiques : voie Homofermentaire et voie Hétérofermentaire (Leveau et Bouix, 1993).

Chez les bactéries lactiques hétérofermentaires, le métabolisme du citrate s'effectue entre pH variant de 6,5 à 4,5, mais la production du diacétyle et d'acétoïne se fait à des pH acides (Starrenburg et Hugenholtz, 1991).

En général il est admis que le citrate n'est pas utilisé comme source d'énergie chez les bactéries aromatiques bien que leur croissance sur lactose soit stimulée par le citrate (Cogan, 1987).

VI .Génétique des bactérie lactiques :

Le matériel génétique des bactéries lactique est organisé en deux structures:

Le chromosome, long filament d'ADN très replié sur lui-même, et les plasmides, petites molécules circulaire d'ADN indépendantes du chromosome (Desmazeaud, 1992).

Les plasmides peuvent déterminer des fonctions diverses:

✓ Fonctions métaboliques:

Fermentation de lactose, fermentation de saccharose, protéolyse extracellulaire, production de di acétyle à partir des citrates, production de polysaccharides extracellulaires, etc. (Dacosta , 2000).

✓ Fonctions de résistance à l'environnement:

Production de bactériocines, résistance aux phages, résistance à certaines bactériocines, résistance à certaines antibiotiques, etc. (Dacosta, 2000).

Les plasmides peuvent être perdus spontanément par la bactérie dans des conditions de milieux défavorables (température élevée, privation nutritionnelle ou éliminé par des traitements chimiques (Desmazeaud, 1992).

Cette possibilité de perdre spontanément des plasmides explique l'instabilité des propriétés technologiques, due à l'apparition de variantes ayant certains gènes et donc certaines fonctions métaboliques, ainsi la perte du plasmide codant pour la protéase de paroi rend les bactéries peu protéolytiques, et entraine une croissance ralentie des germes et une acidification faible du lait (Desmazeaud, 1992).

1.7 Identification des bactéries par la biologie moléculaire

L'identification des bactéries, isolées à partir de prélèvement biologiques, pendant des années, a été basée uniquement sur des critères morphologiques et biochimiques. Le développement des techniques de biologie moléculaire à partir des années 1990 a permis d'introduire ces approches au sein des laboratoires d'analyse biologique. Leur intérêt dans l'identification des bactéries s'est accru au fil des années. Elles permettent d'obtenir un résultat en quelques heures dans les situations d'urgence (identification et typage du germe, et détection des résistances antibiotiques) ou d'identifier un microorganisme si les systèmes utilisés en routine (approche biochimique) sont pris en défaut. De plus, dans des

prélèvements biologiques, elles rendent possible la caractérisation des bactéries si la culture est restée négative, si les bactéries intracellulaires strictes (pour lesquelles la culture est réservée à des laboratoires spécialisés) ou des bactéries encore incultivables à ce jour.

Le gène ciblé est en fonction des informations disponibles sur l'isolat bactérien. Le gène codant l'acide ribonucléique ribosomique (ARNr) 16S est l'outil de choix si les tests précédemment réalisés n'ont pas permis de définir le genre ou l'espèce auxquels appartient l'isolat bactérien. Un système d'identification mettant en jeu un gène plus variable est préférable si des critères d'orientation sont disponibles.

La plupart des techniques mises en oeuvre sont basées sur l'utilisation de l'amplification génique (polymerase chain reaction « PCR ») couplée à une réaction de séquençage du fragment obtenu par la technique de Sanger ou de la PCR en temps réel. Pour cette dernière méthode, la spécificité et la sensibilité sont meilleures, la durée de réalisation de l'analyse est plus courte et c'est le germe recherché ou le groupe de bactéries à caractériser qui commandent le système utilisé.

Dans les années à venir, le développement des techniques de séquençage des génomes entiers va ouvrir des possibilités considérables en ce qui concerne l'identification des bactéries, leur épidémiologie, l'étude de leur sensibilité aux molécules antibiotiques et la caractérisation de leurs facteurs de virulence (**Roux et Rolain, 2014**).

1.7.1 Méthodes basées sur la PCR (réaction en polymérisation en chaîne)

L'identification au rang de l'espèce des bactéries lactiques préalablement isolées de mouts et vins par culture sur plaque. De là, la méthode PCR peut être adaptée à plusieurs niveaux d'identification (genre, espèce ou souche) en fonction du choix des amorces (courte séquence oligonucléotidique). Le principe est le suivant :

L'amorce recherche la région complémentaire pour s'apparier sur la matrice d'ADN qui est analysé. C'est à partir de l'extrémité de l'amorce que la polymérisation s'opère recopiant le brin d'ADN matrice un très grand nombre de fois ce qui conduit à l'amplification (**Castellucci, 2012**).

1.7.2 Amplification de régions consensus et séquençage : sous-unité de l'ARN

ribosomique 16S

1.7.2.1 Principe

Le séquençage de l'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S constitue la méthode de base.

Cette approche s'appuie sur la présence obligatoire de l'ARNr dans les bactéries. La séquence nucléotidique de ce gène permet la classification phylogénétique et l'identification d'isolats inconnus. Car la base de données existante pour ce gène est la plus étendue des gènes bactériens. La séquence nucléotidique de la région entre les gènes codant pour les ARNr 16S et 23S, appelée ITS, peut être utilisée pour l'identification, mais sa séquence est moins conservée. Dans ce cas, la PCR utilise des amorces correspondantes aux régions conservées universelles dans les gènes codant l'ARNr 16S et 23S, de part et d'autre de l'ITS (**Castellucci, 2012**).

1.7.2.2 Protocole générale

Cette méthode nécessite l'extraction de l'ADN de la culture pure à identifier.

L'ADN extrait sert de matrice dans la réaction PCR.

Après séparation par électrophorèse, les amplifiants sont purifiés avec les kits appropriés, puis ils sont séquencés. Les séquences obtenues des gènes codant l'ARNr 16S sont comparées à celles figurant dans les bases de données disponibles (**Chentouf, 2014**).

VII. Intérêts technologiques des bactéries lactiques :

VII.1. Activité acidifiante (production d'acide lactique) :

Le pouvoir acidifiant des bactéries lactiques permet la coagulation du lait (en facilitant l'action de la présure) et l'augmentation de la synérèse du caillé; la participation aux propriétés rhéologiques du produit final; l'inhibition de la croissance des bactéries nuisibles (Papamanoli et *al.*, 2003). Il existe 2 grands types de fermentation bactérienne qui produisent de l'acide lactique :

La fermentation malolactique dans le vin : il s'agit de l'acide malique, naturellement contenu dans le vin, est dégradé en acide lactique sous l'action de la bactérie *Oenococcus oeni* (Shirai *etal.*, 2001).

La fermentation lactique dans le lait et les produits laitiers : l'acide lactique provient de la dégradation du lactose par les bactéries lactiques. Plus un lait est frais, moins il contient d'acide lactique. La concentration en acide lactique dans un lait s'exprime en degré Dornic (°D) : 1°D correspond à 0,1 g d'acide lactique par litre de lait. Un lait frais contient de 15 à 18°D, il caille à 60-70°D. (Shirai *etal.*, 2001, Papamanoli et *al.*, 2003, Ammoret *al.*, 2004).

VII.2. Activité protéolytique :

Les bactéries lactiques possèdent des protéinases et des peptidases nécessaires à la dégradation des protéines du lait en peptides et acides amines. Ceux-ci peuvent alors être transformés en alcools et en acides. Cette activité protéolytique intervient de ce

fait sur le rendement fromager, la texture et la saveur typique du fromage et par conséquent sur les caractéristiques du produit final (Buist et *al.*, 1998).

Les bactéries lactiques sont incapables de synthétiser plusieurs acides aminés, mais sont pourtant bien adaptées à un environnement riche en protéines et pauvre en acides aminés libres ; comme le lait ; grâce à un système protéolytique bactérien complexe (Shiraiet *al.*, 2001 ; Francoiset *al.*, 2007).

Dans la plupart des genres de bactéries lactiques (Lactobacilles, Lactocoques), le système protéolytique met en oeuvre une protéase liée à la paroi cellulaire grâce aux ions Ca^{+2} qui réalise la première étape du processus de dégradation des protéines. Les peptides résultant seront hydrolysés en acides aminés par différentes peptidases membranaires et cytoplasmiques après leur transport dans le cytoplasme, (Fig.02) (Monnet *et al.*, 1993).

Technologiquement l'activité protéolytique constitue un caractère très important qui fait des bactéries lactiques les seuls agents microbiens d'affinages de la majorité des fromages à pâte pressée (Cheddar, fromage de Hollande...), des fromages sans croûte ou à croûte artificielle et des fromages frais.

Durant la phase d'affinage, le fractionnement des caséines modifie la texture de la pâte, certains peptides et acides aminés libérés sont des précurseurs de substances aromatiques (Georgalakiet *al.*, 2002).

La libération des courts peptides hydrophobes conduit à l'apparition du défaut d'amertume ; ce dernier est éliminé grâce aux peptidases qui hydrolysent ces peptides amers en acides aminés (Georgalakiet *al.*, 2002 ; Francoiset *al.*, 2007).

Dans les fromages, l'activité des enzymes protéolytiques des bactéries lactiques est fondamentale car elle va participer à la formation du goût ou des arômes ; la protéolyse due aux bactéries lactiques va surtout conduire à des peptides courts et à des acides aminés libres. Ces derniers sont des précurseurs pour de nombreux produits d'arôme. En effet, la méthionine peut conduire à des composés soufrés caractéristiques. Ceci après leur dégradation par la flore d'affinage (Hemme et *al.*, 1981).

VII.3. Pouvoir aromatisant et pouvoir gazeux :

Les bactéries lactiques sont capables de produire de nombreux composés aromatiques (tels que : l' α -acétolactate, l'acétaldéhyde, le diacétyl, 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 et Larpent, 1996 ; Gerrit *et al.*, 2005 ; Cholet, 2006). La plupart des composés d'arôme sont issus du métabolisme du citrate, l'acétoïne et le diacétyl sont les plus importants (Georgalaki *et al.*, 2002, Francois *et al.*, 2007).

VII.4. Pouvoir lipolytique :

Les propriétés lipolytiques sont généralement faibles chez les bactéries lactiques, les lactocoques sont considérés comme plus lipolytiques que *Streptococcus thermophilus* et les lactobacilles. Elles peuvent cependant présenter un intérêt pour certaines applications fromagères (Béal *et al.*, 2008).

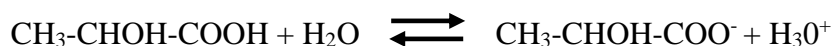
D'une manière générale on distingue les estérases qui hydrolysent de façon préférentielle les esters formés avec les acides gras à chaîne courte (C2-C8) et les lipases qui sont actives sur des substrats émulsifiés contenant des acides gras à chaîne longue (>C8), ces enzymes sont impliquées dans l'hydrolyse de mono, di, et triglycérides (Béal *et al.*, 2008 ; Serhan *et al.*, 2009).

VII.5. Pouvoir texturant :

La capacité des bactéries lactiques à synthétiser des exopolysaccharides (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. *cremoris* est très prometteuse pour la structure et la viscosité des produits laitiers fermentés (Leroy et De Vuyst, 2004 ; Ho *et al.*, 2007).

VII.6. Activité bactériostatique :

La production d'acide lactique est la cause la plus importante de l'inhibition de la croissance et de l'activité des bactéries lactiques. L'acide lactique produit se trouve en solution et est sujet à l'équilibre suivant:



En milieu acide la forme moléculaire domine, en milieu alcalin ou neutre la forme ionisée est quantitativement plus importante. Ces deux formes sont à l'origine de deux types d'inhibition, l'une d'elles devenant prédominante, suivant les conditions de pH.

Si le pH n'est pas maintenu constant, c'est l'ion H_3O^+ qui est inhibiteur. Si le pH est régulé à un pH peu acide (pH 6,0 par exemple), l'ion $\text{CH}_3\text{-CHOH-COO}^-$ est alors présent en quantité plus importante; dans ce cas, l'inhibiteur est proche d'une inhibition par excès de concentration saline, et ne relève plus de la concentration en ion H_3O^+ . Ces deux systèmes d'inhibition sont très différents et peuvent ne pas avoir le même effet sur des cultures associées. Prenons l'exemple de co-cultures de *Streptococcus thermophilus* avec *Lactobacillus bulgaricus*:

- si le pH n'est pas régulé, *L. bulgaricus* continue à croître après arrêt de la croissance de *S. thermophilus* (Accolasetal., 1977) ;

- si le pH est régulé (entre 5,5 et 6,5), la croissance des deux souches s'arrête en même temps.

A pH régulé, l'inhibition par les ions H_3O^+ qui est différente pour les deux souches disparaît ; par contre, elle laisse place à un autre facteur limitant qui peut être un substrat manquant ou une inhibition par le lactate de sodium. La principale modification des conditions physico-chimiques du milieu, responsable de phénomènes d'inhibition est très certainement le gradient de protons dû à la production d'acide lactique.

Il y a un autre mode d'inhibition, le système lactoperoxydase-thiocyanate-peroxyde d'hydrogène qui met en jeu trois facteurs, dont deux sont naturellement présents dans

le lait: la lactoperoxydase (EC 1.11.1.7.) issue de la glande mammaire des bovins et le thiocyanate (SCN) qui, provenant de l'alimentation du bétail, se retrouve dans le lait à des concentrations de 1 à 10ppm (Reiter et Harnvuld,1984). Le troisième facteur est le peroxyde d'hydrogène, H₂O₂ qui, lui, provient du métabolisme des lactobacilles (Dahly et Speck,1968) ou des streptocoques (Reiter, 1978 ; Gruffert et Condon,1983) cultivés en aérobiose partielle mais qui n'est pas naturellement présent dans le lait.

La lactoperoxydase se combine avec le peroxyde d'hydrogène pour oxyder le thiocyanate en un produit d'oxydation à courte durée de vie. Ce composé serait responsable des phénomènes d'inhibition de la croissance et de l'activité des bactéries lactiques (Oramet Reiter,1966). Il semblerait que les streptocoques soient capables,

au moins partiellement de neutraliser le produit d'oxydation du système lactoperoxydase-thiocyanate ou de réparer les dommages causés (Reiter et Harnvuld,1984). Ceci expliquerait ainsi pourquoi le système n'est que bactériostatique contre les streptocoques et les lactobacilles, alors qu'il est bactéricide pour les bactéries coliformes, les *Pseudomonas*, etc...

Il apparaît donc que le peroxyde d'hydrogène peut être auto-inhibiteur. Cependant, toutes les bactéries lactiques ne produisent pas suffisamment de ce composé pour que le système lactoperoxydase-thiocyanate soit activé. Mais, dans le cas d'une culture séquentielle de plusieurs souches, une bactérie produisant peu de peroxyde d'hydrogène peut être inhibée par le système lactoperoxydase-thiocyanate qui a été activé par une autre souche.

3.1 Aspects généraux de la biopréservation

La technologie des barrières

Certaines techniques de conservation suffisent à elles seules à préserver un aliment pour une durée satisfaisante.

Dans le cas de la pasteurisation ou de l'appertisation, la majorité des flores présentes sur le produit est détruite par la chaleur, et le conditionnement hermétique empêche une recontamination ultérieure.

De même le salage ou le séchage modifient de façon radicale le produit (taux de sel supérieur à 15-20%, aw très basse...), ce qui retarde la croissance des flores susceptibles d'entraîner une altération.

Cependant ces techniques s'accompagnent d'une transformation importante du produit. De plus en plus de consommateurs préfèrent aujourd'hui des produits moins fortement préservés, ce qui permet de retrouver des qualités

organoleptiques plus proches du produit d'origine. Une approche permettant d'obtenir une bonne conservation des aliments sans les soumettre à des transformations trop marquées est l'utilisation de la technologie des barrières (Leistner, 2000).

Il s'agit d'appliquer successivement plusieurs procédés ralentissant la croissance des microorganismes.

Chacun n'a que peu d'effet sur les qualités organoleptiques du produit, mais n'est pas suffisante en soi pour obtenir une bonne conservation. C'est alors la succession de ces techniques qui va permettre d'obtenir une inhibition satisfaisante. Les techniques les plus couramment utilisées sont la température (augmentation : cuisson modérée ; diminution : réfrigération), l'activité de l'eau, le pH, le potentiel d'oxydoréduction, l'ajout de conservateurs (nitrates, sulfates, sorbate...) et la biopréservation (Leistner, 2000).

La biopréservation

La biopréservation consiste à inoculer sur un produit des souches bactériennes sélectionnées, de manière à inhiber la flore indésirable qui pourrait s'y trouver, sans modifier les caractéristiques organoleptiques de ce produit (Rodgers, 2001).

La biopréservation fait partie des techniques qui peuvent être appliquées dans le cadre de la technologie des barrières.

Elle peut être utilisée sur des produits légèrement préservés, sur des produits frais emballés sous atmosphère modifiée, ou sur des produits ayant subi une cuisson rapide.

Différents mécanismes entrent en jeu lors de la biopréservation.

L'inhibition des flores indésirables par les bactéries bioprotectrices peut être due à la compétition nutritionnelle lors de la croissance, à la présence de certains produits du métabolisme ou à la production de bactériocines (Helander *et al.*, 1997).

de bactériocine purifiée directement sur un produit alimentaire, parfois considérée comme une forme de biopréservation (Stiles, 1996) se rapproche d'avantage de l'ajout d'additifs conservateurs. A l'heure actuelle, seule la nisine est autorisée pour ce genre de traitement.

Les bactéries lactiques dans la biopréservation

Les bactéries lactiques sont les bactéries les plus intéressantes pour la biopréservation. De nombreuses études ont montré leur potentiel dans toutes sortes de produits alimentaires (voir figure 4). Certaines bactéries lactiques peuvent se développer rapidement dans les produits réfrigérés et emballés sous vide ou sous atmosphère modifiée.

Certaines souches produisent des composés antimicrobiens (acides organiques, peroxyde d'hydrogène, diacétyl et bactériocines) et elles sont généralement reconnues sans risques dans l'alimentation.

De surcroît, elles disposent auprès des consommateurs d'une image naturelle et bénéfique pour la santé, due à leur présence dans des produits laitiers et aux effets probiotiques de certaines souches (pour revue, voir Stiles, 1996 et Guinane *et al.*, 2005).

Espèce	Produit d'origine	Activité inhibitrice	Type d'activité	Essais	Référence
<i>Ec. faecium</i>	Fromage	<i>Listeria</i>	Bactériocine	In vitro	Alvarado <i>et al.</i> , 2005
<i>Lc. lactis</i>	Fromage	<i>Listeria</i>	Bactériocine	Fromage	O'Sullivan <i>et al.</i> , 2006
<i>Lc. lactis</i> sp. <i>lactis</i>	Germes de luzerne	<i>Listeria</i> , <i>E. coli</i> et <i>Salmonella</i> <i>Listeria</i>	Bactériocine	In vitro	Kelly <i>et al.</i> , 1996
<i>Ln. mesenteroides</i>	Produits végétaux prêts à consommer	<i>Listeria</i>	Acidification et bactériocine	In vitro	Wilderdyke <i>et al.</i> , 2004
	Salade de chou, maquereaux fumés		Bactériocine	In vitro	Kelly <i>et al.</i> , 1996
<i>Lb. casei</i>	Légumes	<i>Ae. hydrophilia</i>	Bactériocine	Salade composée	Vescovo <i>et al.</i> , 1997
<i>Lb. plantarum</i>	Choucroute	<i>Listeria</i> , <i>Listeria</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Staphylococcus</i>	Acidification	Radis	Wilson <i>et al.</i> , 2005
	Bière		Bactériocine	Salami	Todorov <i>et al.</i> , 2007
<i>Lb. sakei</i>	Charcuterie	<i>Listeria</i> , <i>Brochotrix</i>	Inconnu	Jambon	Vermeiren <i>et al.</i> , 2004
<i>Lb. curvatus</i>	Charcuterie	<i>Listeria</i> , <i>Brochotrix</i>	Inconnu	Jambon	Vermeiren <i>et al.</i> , 2004

Figure 04 : Exemples de bactéries lactiques utilisées en biopréservation.

Parmi les composés inhibiteurs issus du métabolisme des bactéries lactiques on peut citer les acides lactique et acétique, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle et les bactériocines.

Les acides organiques sont les produits directs de la fermentation. Leur libération dans le milieu entraîne un abaissement du pH qui ralentit la croissance bactérienne. Ainsi Wilson *et al.* (2005) ont démontré que l'inhibition de *L. monocytogenes* dans des produits végétaux par une souche de *Lb. plantarum* était due à la production d'acide lactique.

Cependant dans certains produits une forte diminution du pH peut être considérée comme un signe d'altération.

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est produit en présence d'oxygène sous l'action d'enzymes telles que la NADH oxydase, la pyruvate oxydase ou la superoxyde dismutase.

Les bactéries lactiques ne disposant pas de catalase pour le réduire, ce composé s'accumule dans le milieu. Son potentiel d'oxydation élevé lui permet d'altérer les acides nucléiques et d'oxyder les lipides, entraînant une inhibition des microorganismes. Le diacétyle est un produit de la fermentation du citrate. Il est produit principalement par les bactéries des genres *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus* et *Lactobacillus*. Son action aromatique est recherchée dans certains fromages tel que le Gouda. Son activité inhibitrice est en général peu importante, due à la faible quantité présente dans les produits.

Les bactériocines sont des composés protéiques antimicrobiens produits par les bactéries.

Ce sont des petits peptides qui sont produits par le ribosome sous forme mature ou sous forme d'un précurseur nécessitant une étape de maturation enzymatique ultérieure.

On les distingue des antibiotiques, qui sont eux des produits secondaires du métabolisme assemblés par des réactions multi-enzymatiques.

L'effet bactéricide est généralement du à la formation de pores dans la membrane plasmique de la cellule cible (Jack *et al.*, 1995). Leur spectre d'action est souvent limité aux bactéries de genres ou d'espèces proches de celui de la bactérie productrice, mais leur efficacité contre les bactéries pathogènes susceptibles de se retrouver dans les aliments est incontestable, par exemple contre *L. monocytogenes* (Jack *et al.*, 1996) ou *Clostridium botulinum* (Rodgers *et al.*, 2003).

Les bactériocines sont classées en 3 groupes selon leur structure :

_ Les bactériocines de classe I sont dénommées les lantibiotiques. Ce sont des petits peptides (moins de 5kDa) qui subissent une modification post-traductionnelle et qui contiennent des acides aminés modifiés tels que la lanthionine. On y retrouve par exemple la nisine.

_ La classe II est elle-même subdivisée en trois sous-classes : IIa, IIb et IIc.

Tous les peptides compris dans cette classe sont petits (environ 10 kDa), thermorésistants et ne subissent pas de modification post-traductionnelle. Les bactériocines de classe IIa sont des peptides à activité anti-listeria avec une partie N-terminale comprenant une séquence conservée du type Tyr-Gly-Asn-Gly-Val et un pont disulfure. Leur pI est compris entre 8 et 10. Les bactéries lactiques sont les principaux producteurs de bactériocines de classe IIa. Le peptide de référence de cette classe est la pédiocine (Cleveland *et al.*, 2001 ; Drider *et al.*, 2006).

Les bactériocines composées de deux peptides forment le groupe IIb.

Enfin le groupe IIc comprends les bactériocines à un seul peptide ne rentrant pas dans les catégories précédentes.

_ La classe III comprend les gros peptides (plus de 30 kDa) thermosensibles, sur lesquels peu d'informations sont encore disponibles.

Actuellement la seule bactériocine autorisée en temps qu'additif alimentaire est la nisine produite par *Lc. lactis* subsp. *lactis*. Au sein de l'Union Européenne la nisine (E234) est autorisée comme agent de conservation dans les aliments tels que les fromages affinés et les fromages fondus, dans certains puddings, ainsi que dans la crème caillée et le mascarpone (directive 95/2/CE).

Cependant, l'ajout d'additifs est interdit dans certains produits comme le saumon fumé. Les restrictions concernant l'ajout de bactéries vivantes dans les aliments ont été discutées par l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA, www.efsa.europa.eu).

Il a été proposé de mettre en place un système appelé présomption conditionnelle d'innocuité (Qualified Presumption of Safety, QPS), prenant en compte les connaissances scientifiques accumulées sur un type de microorganisme afin de décider d'autoriser ou non son introduction dans l'alimentation. Ce concept est très proche de celui utilisé aux Etats-Unis (GRAS).

1.6 Bactériocines des bactéries lactiques

1.6.1 Historique et définition

En 1925, Gratia appelait «colicines», des substances antimicrobiennes sécrétées par *E. coli* et actives contre *E. coli* V. En 1928, Rogers a rapporté pour la première fois une substance antimicrobienne produite par *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* autre que les acides organiques et le peroxyde d'hydrogène. Cette substance a été identifiée plus tard par **Hirsch (1951)**, qui a démontré sa nature protéique et l'a nommée "nisine". En 1953, Jacob et ses collaborateurs proposèrent le terme plus général de « bactériocine » à ces substances.

Différentes définitions des bactériocines a été données au cours du temps 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 sont des peptides extracellulaires, thermostables, synthétisés par voie ribosomique doués d'une activité bactéricide ou bactériostatique contre les espèces proches (spectre étroit) ou d'autres genres (spectre large) et à laquelle la

cellule productrice dispose d'un mécanisme d'immunité spécifique (Cotter *et al.*, 2005).

1.6.2 Classification

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

Nous donnons en figure 5 la classification proposée par (Papagianni, 2003).

1.6.2.1 Classe I :

les lantibiotiques : Les lantibiotiques sont des peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post-traductionnellement, comme la lanthionine, la β -méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine.

Les lantibiotiques peuvent être divisés en deux type ;

Sous classe Ia : qui comprend des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés.

Sous classe Ib : qui comprend les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés (McAuliffe *et al.*, 2001).

Tableau 07 : Classification des bactériocines (Papagianni, 2003).

Classe	Caractéristiques
<p>Classe I Lantibiotique</p>	<p>Peptides ribosomiquement synthétisés, post traductionnellement modifiés contiennent des acides aminés inhabituels : lanthionines et β-méthyle lanthionine. Masse moléculaire : 2-5KDa Sous classe A: molécules allongées , flexibles. Sous classe B : molécules globulaires sans charge nette ou chargées négative.</p>
<p>Classe II Non lantibiotique</p>	<p>Peptide stable à la chaleur, formés exclusivement avec des acides aminés non modifiés. Synthétisés sous forme d'un pré peptide inactive clivé à la partie N-terminale pour donner la forme active. Masse moléculaire : <10KDa. Sous classe IIa : pediocine like peptide, peptide simple contient la séquence YGNGVN terminal nommé aussi (Listeria active peptide). Sous classe IIb : bactériocines à deux peptides. Sous classe IIc : autres bactériocines.</p>
<p>Classe III Bactériolysines</p>	<p>Protéines thermolabiles Masse moléculaire > 30KDa</p>
<p>Classe IV</p>	<p>Complexe bactériocines et parties lipidiques ou Glucidiques.</p>

1.6.2.2 Classe II :

non-lantibiotiques

Ce sont des peptides de taille inférieure à 10 kDa, stables à la chaleur, ne contenant pas d'acides aminés modifiés. Leur point isolélectrique varie entre 8 et 10. Cette dernière est subdivisée en trois sous-classes ;

sous-classe IIa Ces bactériocines 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. 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. Il semble par ailleurs qu'il leur conférerait une meilleure activité antimicrobienne, une meilleure résistance à l'exposition à des hautes températures et un spectre d'action plus large (**Richard et al., 2006**).

sous-classe IIb: Elle comprend les bactériocines ayant besoin de deux peptides pour avoir une activité.

Deux types de bactériocines de classe IIb peuvent être distingués : le type **E** (**Enhancing**) où la fonction d'un des deux peptides est d'augmenter l'activité de l'autre et le type **S** (**Synergy**) où les deux peptides sont complémentaires.

sous-classe IIc: Toutes les autres bactériocines de classe II ne pouvant pas être classées dans les sous-classes a et b.

1.6.2.3 Classe III :

les bactériolysines : Les bactériolysines sont des protéines de taille supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur.

Cette classe ne contient que quatre bactériocines : **l'helveticin J** produite par *Lactobacillus helveticus* **l'enterolysin A** produite par *Enterococcus faecium*, **la zoocin A** produite par *Spreptococcus zooepidemicus* et **la millericin B** produite par *Streptococcus milleri* (**Papagianni, 2003**).

1.6.2.4 Classe IV :

Une quatrième classe se compose des bactériocines qui forment de grands complexes avec d'autres macromolécules (**Kalenhammer, 1993**), requérant une partie glucidique ou lipidique (Papagianni, 2003).

Cependant, actuellement aucune bactériocine n'a été purifiée ou décrite et il ya a bonne raison de croire que ce type de bactériocine est un objet façonné dû aux propriétés cationiques et hydrophobes des bactériocines qui ont comme conséquence complexant avec d'autres macromolécules dans l'extrait brut (**Cleveland et al., 2001**).

1.6.3 Production des bactériocines

Les bactériocines sont produites à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de croissance (**Dortu et Thonart., 2009**).

Différentes protéines sont impliquées dans la production des bactériocines et sa régulation. Les bactériocines sont produites sous forme d'un prépeptide non-biologiquement actif qui subira des modifications posttraductionnelles pour aboutir au peptide actif.

Cette production est souvent régulée par un système de Quorum Sensing, un mécanisme permettant à certains gènes d'être exprimés en fonction de la densité de la

population bactérienne, L'expression de gènes localisés soit sur le chromosome, comme c'est le cas de la mersacidine (**Altena et al., 2000**), soit sur un plasmide, comme c'est le cas de la sakacine A (**Axelsson et al., 1995**), ou sur un transposon, comme c'est le cas de la nisine (**Rauch et al., 1992**).

Les facteurs influençant la production de bactériocines sont principalement la souche productrice, la température, le pH, la composition du milieu et la technologie de fermentation employée (**Dortu, 2008**).

1.6.4 Mécanismes d'action des bactériocines

Le siège d'activité des bactériocines est la membrane cellulaire, Cependant, les modes d'action des bactériocines sur la membrane sont variés.

Certains lantibiotiques, comme par exemple la nisine, montre un mode d'action double : d'une part elles s'attachent au lipide II, le principal transporteur des unités de peptidoglycane du cytoplasme à la paroi cellulaire, ce qui empêche la synthèse correcte de

la paroi cellulaire causant la mort de la cellule: d'autre part elles utilisent le lipide II comme point d'ancrage pour initier le processus d'insertion dans la membrane et la formation de pore provoquant la mort rapide de la cellule. Les bactériocines à deux peptides comme par exemple la lacticine 3147, peuvent avoir cette activité double partagée entre les deux peptides (**Wiedemann et al., 2001**).

D'un autre côté, le mécanisme d'action supposé des bactériocines de classe IIa est l'interaction de la bactériocine avec la membrane ou un récepteur, la mannose perméase, pour ensuite former un pore dans la membrane de la cellule ce qui induit la perméabilisation de la membrane et la mort de la cellule (**Dalet et al., 2000**).

Le mécanisme de formation des pores n'est pas connu même si l'hypothèse la plus courante est l'assemblage de différentes molécules de la bactériocine (**Diep et al., 2007**).

Les pores formés par les bactériocines de classe IIa causent la perte d'ion potassium ainsi que d'acides aminés et d'autres molécules de faible poids moléculaire ce qui dissipe les deux composantes de la force proton motrice (**Bauer et al., 2005**).

Une exception au mode d'action membranaire est représentée par les bactériocines de la classe III (bactériolysine) tel que la lysostaphine, dont l'action bactéricide consiste à cliver la partie peptidique du peptidoglycane des cellules cibles (**Nilsen et al., 2003**) (**Figure 6**).

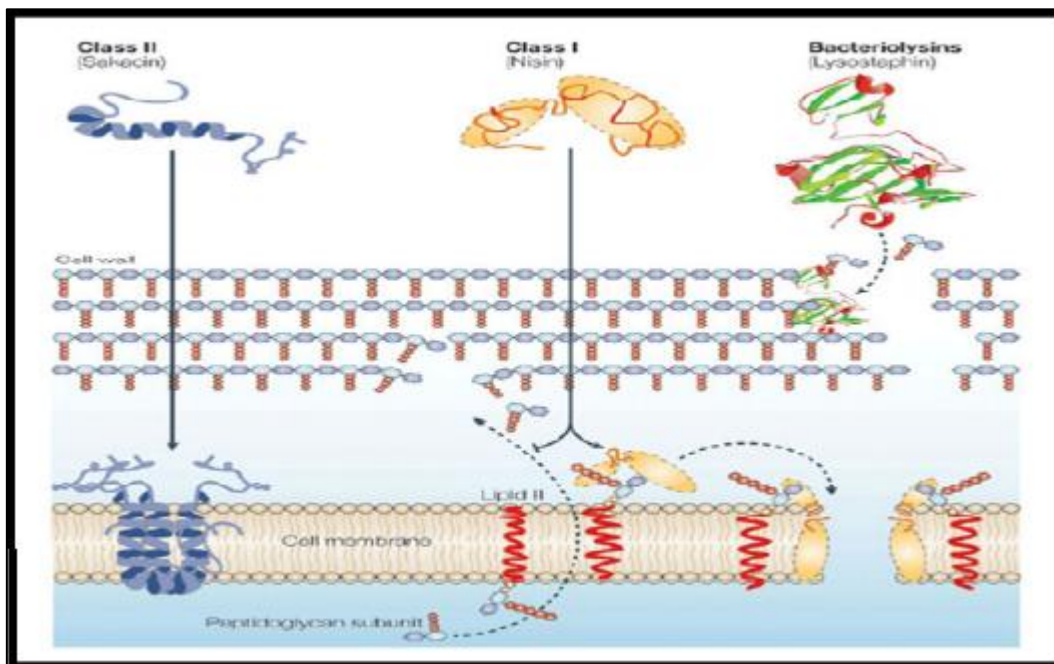


Figure 05 : Mécanismes d'action des bactériocines (Nilsen *et al.*, 2003).

1.6.5 Spectre d'activité bactériocinique

Les bactériocines des bactéries lactiques exercent leur activité létale uniquement sur les bactéries Gram positif en provoquant ou non leur lyse cellulaire. Le spectre d'activité est généralement plus large que celui des colicines produites principalement par des souches d'*Escherichia coli* (**tableau 8**).

Le spectre d'activité des bactériocines de la sous classe IIa est variable.

Il est plus ou moins large mais touche essentiellement des bactéries phylogénétiquement proches de la souche productrice. Dans tous les cas, le genre *Listeria* est inhibé.

Il comprend également des bactéries lactiques et d'autre bactéries a Gram positif, en particulier des espèces pathogènes ou indésirables comme *Staphylococcus aureus*, *Clostridium sp*, *Bacillus sp*, et *Micrococcus sp*. Les bactériocines des autre classes sont généralement connues pour posséder un spectre d'activité étroit, limité a la même espèce ou à des bactéries phylogénétiquement proches de la souche productrice (**Cascales *et al.*, 2007**).

Tableau 08 : Bactériocine produite par des bactéries probiotiques (Gillor,2008).

Souche(s) inhibée (s)	Souches productrice	Bactériocine
Bactériocine de la classe I		
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Lactobacillus</i> UCC188	ABP-118
<i>E.coli</i> O157:H7	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Propionibacterium freudenreichii</i>	BovamineTM
<i>Vibrio anguillarum</i>	<i>L acidophilus</i>	Lacticine B
	<i>Bacillus subtilis</i>	Bacillocine 22
	<i>Clostridium butyricum</i>	Butyricyne 7423
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Streptococcus salivarius</i> K12	Salivaricine
<i>Streptococcus sobrius</i> <i>Saetreptococcus mutans</i>		Salivaricine A &B
<i>Micrococcus luteus</i> <i>Streptococcus anginosus</i> <i>Eubacterium saburreum</i>		Sarivaricine B
<i>Enterococcus</i> spp; <i>Neisseria gonorrhoeae</i>		<i>S. salivarius</i> CRL1328
<i>E. coli</i> O111, <i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Lactobacillus casei</i> L26	UNa
<i>Aeromonas salmonicida ruckeri</i>	<i>Carnobacterium Maltaromaticum</i> B26 et B33	Carnocine
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	UN
<i>H. pylori</i> ; <i>Helicobacter felis</i>	<i>L. acidophilus</i>	UN
Bactériocines de la classe II		
<i>Enterococcus</i> , <i>Listeria Monocytogenes</i> ; <i>klebsiella Pseudomonas</i> ; <i>Shigella</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Pediocine
<i>Salmonella dusseldorf</i> SA13 <i>E. coli</i>	<i>Enterococcus faecium</i> EK13	Entéroicine
<i>Salmonella pullorum</i>	<i>E. faecium</i>	

1.6.6 Le Conditionnement des bactériocines

Il est très difficile de conditionner les bactériocines sous une forme purifiée.

La purification des bactériocines est une procédure longue et coûteuse qui nécessite la mise en oeuvre de nombreuses techniques à savoir une précipitation des protéines au sulfate d'ammonium, différentes combinaisons de chromatographies sur colonne telles que des échanges d'ions ou des interactions hydrophobes et une étape finale de chromatographie liquide à haute performance en phase inverse. Ces traitements ne sont pas applicables à l'échelle industrielle.

La stratégie souvent mise en oeuvre consiste dès lors en l'adsorption de la bactériocine sur la cellule productrice suivie d'une centrifugation ou d'une ultrafiltration de la culture et de la désorption de la bactériocine par abaissement du pH à 2 et augmentation de la concentration en chlorure de sodium. Les bactériocines semi-purifiées peuvent alors être conditionnées sous forme sèche par atomisation ou lyophilisation par exemple (**Parente et al., 1997**).

La nisine, la seule bactériocine légalement approuvée comme additif alimentaire, est commercialisée sous une forme semi-purifiée.

1.6.7 Domaines d'applications des bactériocines

Les bactériocines peuvent être appliquées sous une forme purifiée, semi-purifiée. Les bactéries productrices peuvent également être appliquées dans les produits alimentaires, la bactériocine sera alors produite in situ. (Figure 8).

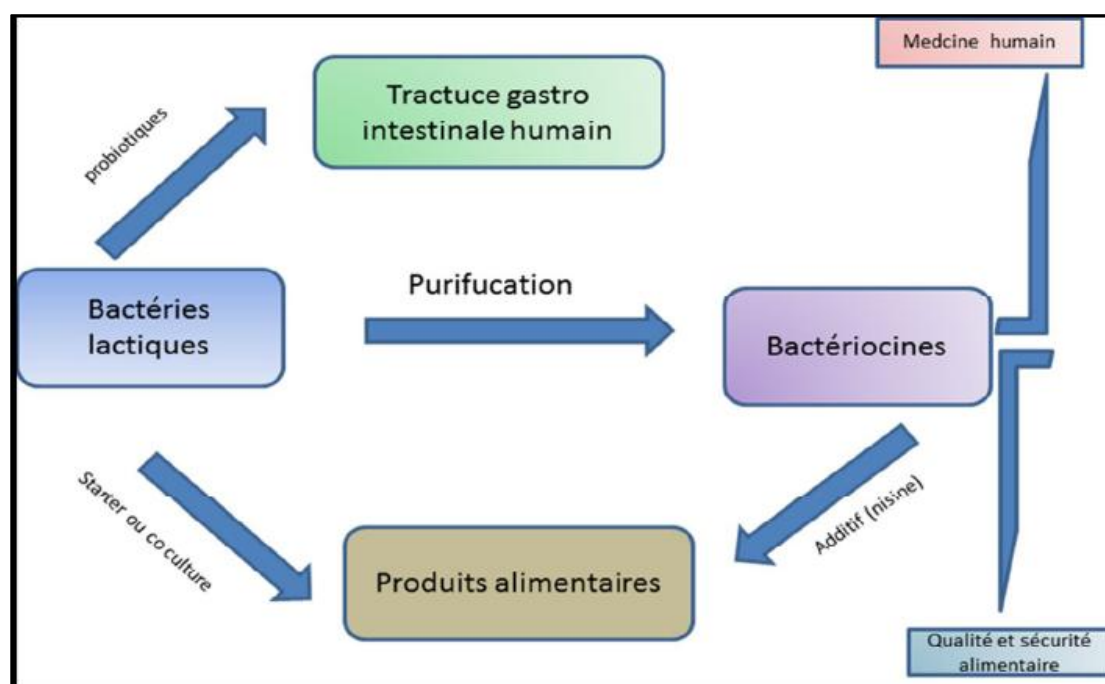


Figure 06 : Vue d'ensemble des applications potentielles des bactériocines (DeVuyst et Leroy, 2007).

1.6.7.1 Domaine alimentaire

L'utilisation des bactériocines dans le domaine alimentaire est avantageuse non seulement à cause de leur large spectre d'activité, mais aussi parce qu'elles sont non toxiques, facilement dégradables par les enzymes digestives et ne compromettent pas la prise des médicaments (Ryan et al., 1998). 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 (Harlander, 1993).

Ces dernières années, l'application des bactériocines dans la technologie a gagné une grande attention.

Malgré le fait que la majorité des bactériocines soit des substances naturelles non toxiques, seule la nisine est reconnue jusqu'à maintenant comme « GRAS » (Generally Recognized As Safe) (Delves-Broughton, 1990).

Ainsi, la nisine est utilisée comme additif dans les aliments en conserves, notamment dans les produits laitiers, les soupes et les poudings à base de céréales (Smaoui, 2010).

1.6.7.2 Domaines de la médecine humaine

L'utilisation des bactériocines n'est pas restreinte au domaine alimentaire, plusieurs études ont démontré que l'utilisation répandue des antibiotiques pour traiter et prévenir les infections, engendrait de sérieux problèmes de toxicité et de résistance. Par leurs caractéristiques mentionnées précédemment, les bactériocines ont été énormément appréciées comme étant des agents de thérapie naturelle, alternative aux antibiotiques, puisque l'effet inhibiteur des bactériocines pourrait réduire les effets nocifs engendrés par l'antibiothérapie.

Quelques lantibiotiques sont utilisables dans les applications médicales pour l'espèce humaine et animale.

L'épidermine produite par *Staphylococcus epidermidis* est active contre *Propionibacterium acnes*, qui cause l'acné.

Ce lantibiotique est utilisé dans la thérapie pour remplacer l'usage habituel de l'érythromycine et de la vitamine A. Cette application montre plusieurs avantages tels que l'absence de résistance aux lantibiotiques et leur faible coût de production par rapport aux antibiotiques. La nisine, quant à elle, peut être utilisée dans le traitement des ulcères gastriques vu sa stabilité aux pHs acides et son activité contre *Helicobacter pylori* (**De Vuyst et Vandamme, 1994**). Trois autres bactériocines produites par *Lactobacillus johnsonii* LA1, *Lactobacillus casei* YIT 9029 et *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 montrent une activité inhibitrice contre l'agent pathogène gastrique humain *Helicobacter pylori* qui cause des ulcères gastriques (**Avonts et De Vuyst, 2001**).

1.6.7.3 Domaine agricole

La protection des plantes contre les microorganismes phytopathogènes ainsi que la préservation des semences, sont les objets de l'exploitation des bactériocines en agriculture.

Dans ce cas, les substances antibactériennes et substances antifongiques seront associées afin de lutter contre les ravageurs phytopathogènes (**Paik et al., 1997**).

1.7 Identification des bactéries par la biologie moléculaire

L'identification des bactéries, isolées à partir de prélèvement biologiques, pendant des années, a été basée uniquement sur des critères morphologiques et biochimiques.

Le développement des techniques de biologie moléculaire à partir des années 1990 a permis d'introduire ces approches au sein des laboratoires d'analyse biologique. Leur intérêt dans l'identification des bactéries s'est accru au fil des années. Elles permettent d'obtenir un résultat en quelques heures dans les situations d'urgence (identification et typage du germe, et détection des résistances antibiotiques) ou d'identifier un microorganisme si les systèmes utilisés en routine (approche biochimique) sont pris en défaut. De plus, dans des prélèvements biologiques, elles rendent possible la caractérisation des bactéries si la culture est restée négative, si les bactéries intracellulaires strictes (pour lesquelles la culture est réservée à des laboratoires spécialisés) ou des bactéries encore incultivables à ce jour.

Le gène ciblé est en fonction des informations disponibles sur l'isolat bactérien. Le gène codant l'acide ribonucléique ribosomique (ARNr) 16S est l'outil de choix si les tests précédemment réalisés n'ont pas permis de définir le genre ou l'espèce auxquels appartient l'isolat bactérien. Un système d'identification mettant en jeu un gène plus variable est préférable si des critères d'orientation sont disponibles.

La plupart des techniques mises en oeuvre sont basées sur l'utilisation de l'amplification génique (polymerase chain reaction « PCR ») couplée à une réaction de séquençage du fragment obtenu par la technique de Sanger ou de la PCR en temps réel. Pour cette dernière méthode, la spécificité et la sensibilité sont meilleures, la durée de réalisation de l'analyse est plus courte et c'est le germe recherché ou le groupe de bactéries à caractériser qui commandent le système utilisé.

Dans les années à venir, le développement des techniques de séquençage des génomes entiers va ouvrir des possibilités considérables en ce qui concerne l'identification des

bactéries, leur épidémiologie, l'étude de leur sensibilité aux molécules antibiotiques et la caractérisation de leurs facteurs de virulence (**Roux et Rolain, 2014**).

1.7.1 Méthodes basées sur la PCR (réaction en polymérisation en chaîne)

L'identification au rang de l'espèce des bactéries lactiques préalablement isolées de mouts et vins par culture sur plaque.

De la méthode PCR peut être adaptée à plusieurs niveaux d'identification (genre, espèce ou souche) en fonction du choix des amorces (courte séquence oligonucléotidique).

Le principe est le suivant : l'amorce recherche la région complémentaire pour s'apparier sur la matrice d'ADN qui est analysé.

C'est à partir de l'extrémité de l'amorce que la polymérisation s'opère recopiant le brin d'ADN matrice un très grand nombre de fois ce qui conduit à l'amplification (**Castellucci, 2012**).

1.7.2 Amplification de régions consensus et séquençage : sous-unité de l'ARN ribosomique 16S

1.7.2.1 Principe

Le séquençage de l'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S constitue la méthode de base.

Cette approche s'appuie sur la présence obligatoire de l'ARNr dans les bactéries. La séquence nucléotidique de ce gène permet la classification phylogénétique et l'identification d'isolats inconnus.

Car la base de données existante pour ce gène est la plus étendue des gènes bactériens. La séquence nucléotidique de la région entre les gènes codant pour les ARNr 16S et 23S, appelée ITS, peut être utilisée pour l'identification, mais sa séquence est moins conservée.

Dans ce cas, la PCR utilise des amorces correspondantes aux régions conservées universelles dans les gènes codant l'ARNr 16S et 23S, de part et d'autre de l'ITS (**Castellucci, 2012**).

1.7.2.2 Protocole générale

Cette méthode nécessite l'extraction de l'ADN de la culture pure à identifier.

L'ADN extrait sert de matrice dans la réaction PCR. Après séparation par électrophorèse, les amplifiants sont purifiés avec les kits appropriés, puis ils sont séquencés.

Les séquences obtenues des gènes codant l'ARNr 16S sont comparées à celles figurant dans les bases de données disponibles (**Chentouf, 2014**).

Conclusion :

Les bactéries lactiques présentent des activités métaboliques assez diversifiées et une capacité d'adaptation à différents environnements. Cette diversité est responsable de leur large gamme d'applications à l'échelle industrielle (Streit et *al.*, 2007).

Dans l'industrie alimentaire, ces microorganismes permettent la conversion d'une grande variété de matières premières, conduisant ainsi à de nombreux produits : les saucissons, les laits fermentés, les fromages, les olives fermentés et certains vins. Parmi ces applications, l'industrie laitière est, sans doute, le plus grand utilisateur de ferments lactiques commerciaux (Axelsson, 2004 ; Streit et *al.*, 2007).

Les bactéries lactiques sont également utilisées dans l'industrie chimique (production d'acide lactique), dans le domaine médical (notamment pour le traitement de dysfonctionnements intestinaux) et dans l'industrie des additifs alimentaires (production d'exopolysaccharides). Elles sont aussi utilisées pour la production de bactériocines et des protéines thérapeutiques (Rodriguez et *al.*, 2003).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ammor, S., Rachman, C., Chaillou, S., Prévost, H., Dousset, X., Zagorec, M., Dufour, E et Chevallier, I. (2004). Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *Food Microbiol.*05-11.

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.

Béal C., Marin M., Fontaine E., Fonseca F. et 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.

Bekal S., Jozef V. B., Bart S., Dominique G., Samia H .,Divies C., et Prevost F., (1988). Purification of *Leuconostocmesenteroides* Citrate lyase and cloning and caractérisation of the cit CDEFG gene cluster . *J. Bacteriol.*180 : 647 - 654 .

Bissonnette, F., Labrie, S., Deveau, H., Lamoureux, et M., Moineau, S. (2000). Characterization of mesophilic mixed starter cultures used for the manufacture of aged Cheddar cheese. *J. DairySci.* 83: 620-627.

Bourgeois C. M. et Leveau J.Y. (1991). Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires. *2 ème ed. Lavoisier-Tech et Doc* : 153-202.

Bourgeois C.M. et Larpent J.P., (1996). Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentations alimentaires. *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris. 432-704.

Bugnicourt, M. (1995). Dictionnaire de microbiologie générale. Edition ellipses.

Buist , G. , Venema, G., et kok, J. (1998). Autolysis of *Lactococcus lactis* influenced by proteolysis. *Journal of biotechnology*. N° 22: 5974-5953.

Bustos, G., Moldes A.B., Cruz J.M et Dominguez, J.M. (2005). Influence of the Metabolism Pathway on Lactic Acid Production from Hemicellulosic Trimming Vine Shoots Hydrolyzates Using *Lactobacillus pentosus*. *Biothechnology Prog.*, 21: 793-798.

Carr, F.J., Chill, D et Maida, N., (2002). The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Rev. Microbiol.*, 28: 4, 281-370.

Charalampopoulos, D., Pandiella S.S et Webb, C. (2002). Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria in cereal-based substrates. *Journal of Applied Microbiology*, 92:851-859.

Cherigene, A., Chougrani, F et Bensoltane, A. (2006). Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian goat's milk. *Pakistan J. Biol. Sci.*, 9(7): 1242-1249.

Cholet O., (2006). Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire. *Institut National Agronomique Paris-Grignon. Ecole Doctorale ABIES. UMR de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires INRA, INA*. 16.

Chougrani, F., Cherigene, A et Bensoltane, A. (2006). Identification and some technological properties of lactic acid bacteria isolated from Algerian ewe's milk. *Egypt. Jo. App. Sci.* 21, (8): 148-157.

Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F et Chikindas, M.L. (2001). Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation, *Int. J. Food Microbiol.* 71: 1-20.

Cogan t. M., (1975). Citrate utilisation in milk by *Leuconostoc crémoris* and *Streptococcus diacetylactis*. *J. Dairy . Sci.* 42 : 139 - 146.

Cogan, T.M. (1987). Co-metabolism of citrate and glucose by *Leuconostoc* sp. Effects on growth substrates and products. *J. Appl. Bacteriol.* 63: 551-558.

Collins, M.D., J. Samelis, J. Metaxopoulos, et Wallbanks, S. (1993). Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostocparamesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 595-603.

De Roissart, H. B (1986). Bactéries lactiques. I. N. R. A. station de recherche laitière. Clermont Ferrand France.

Dacosta Y., 2000 la bio –protection des aliments. L’antagonisme microbien au service de la sécurité et de la qualité microbiologique .Rappel de données indispensables .Edition yvesdacosta, Paris .pp :10-30

Dellaglio, H., de Roissart, H., Torriani, S., Curk, M.C et Janssens, D. (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In: de Roissart, H., Luquet, F.M. (Eds.), Les bactéries lactiques: aspects fondamentaux et technologiques. Loriga, Uriage, pp. 25-116.

Desmazeaud M ., 1992 . Les bactéries lactiques. Les groupes microbiens d’intérêt laitier .Edition Hermier J.,J. lenoir et F .Weber . CEPIL , Paris ,pp : 568,570

Desmazeaud, M.J. (1992). L’état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. *Le lait* .63:267-316.

Divies C ., (1991) . Le métabolisme de l’acide citrique par les bactéries lactiques .*Actes du colloque LACTIC .91* : 103 - 119.

Diviès, C., Frey, L., Hubert, J.C et De Roissard, H. (1994). Métabolisme d’autres substrats carbonés par les bactéries lactiques., p. 291-307, *Bactéries lactiques*, vol. I. De Roissard H. et Luquet F.M., Loriga.

Drouault S. et Corthier G., (2001). Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Vet. Res.*, 32: 101-117.

Euzéby, J.P (1997). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1997, **47**, 590-592. (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. <http://www.bacterio.net/> mise à jour du 28 avril 2010).

Falsen E, Pascual C, Sjoden B, Ohlen, M et Collins, M. D (1999). Phenotypic and phylogenetic characterization of a novel *Lactobacillus* species from human sources: description of *Lactobacillus* sp. nov. *Int. J of Syst. Bact.* 49.

Fitzpatrick, J.J., et O'Keeffe, U. (2001). Influence of whey protein hydrolyzate addition to whey permeate batch fermentations for producing lactic acid. *Process Biochem.*, 37: 183-186.

Fitzsimmons, N.A., Cogan, T.M., Condon, S et Beresford, T. (1999). Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria in mature cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3418-3426.

Francois, Z.N., Nour El houda, Florance, F.A., Paul M.F., Félicite T.M et EL soda, M. (2007) .Biochemical properties of some thermophilic lactic acid bacteria strains from traditional fermented milk relevant to their technological performance as starter's cultures. *Biotechnology.* 6 (1):14-21.

Garvie E. I. (1986). Gram positive coccigenus *Leuconostocin* bergeys manual of systematic bacteriology, Vol: 2, 9th Ed. *Williams and Wilkins Co Baltimor*: 1071-1075.

Georgalaki, M. D., Papadelli, M., Anastasiou, R., Kalantzopoulos,G., etTsakalidou, E. (2002). Purification and characterization of the X-prolyl-dipeptidylaminopeptidase (PepX) from *Streptococcus macedonicus* and cloning of the pepX gene. *Le Lait*, 82, 657–671.

Gerrit S., Bart A.S. et Wim J.M.E., (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS. Microbiol. Rev.* 29 : 591-610.

Gonzalez, C., Langdon, G.M., Bruix, M., Galvez, A., Valdivia, E., Maqueda, M et Rico, M. (2000). *Bacteriocin* AS-48, a microbial cyclic polypeptide structurally and functionally related to mammalian NK-lysin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*; 97: 11221-11226.

Guiraud J.P. etRosec J.P., (2004). Pratique des normes en microbiologie alimentaire. *AFNOR.* 237-251.

Guiraud, JetGalzy, P. (1980). L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. *L'usine Nouvelle Paris* :130 - 152.

Harris L., Daeschel M., Stiles M et Klaenhammer T. (1989). Journal of Food Protection, 52, 384.

Hemme, D., Nardi, M et Wahl, D. (1981). propriétés des lactico- déshydrogénases des *Streptococcus thermophilus* indépendantes du fructose (1-6) di phosphate. *Le Lait*, 6:1-18.

Ho T.N.T., N. Tuan N., Deschamps A. et caubet R., (2007). Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. *Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology*.134-142.

Hofvendahl, K et Hahn-Hagerdal, B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources(1). *Enzyme Microbiology and Technology*, 26:87-107.

Hugenholtz J ., (1993). Citrate métabolisme in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol*

Isolauri. E, Sütas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H et Salminen. S. (2001). Probiotics Effects on immunity. *Am. J. Clin. Nutr.*, Vol. 73, N° 2. 444-450.

Jozala, A.F., de Lencastre Novaes, L.C., Cholewa, O., Moraes, D et Penna, T.C.V. (2005). Increase of nisin production by *Lactococcus lactis* in different media. *Afr. J. Biotechnol.* 4: 3, 262-265.

Juillard, V., Foucaud, C., Desmazaud, M.J et Richard, J. (1996). Utilisation des sources d'azote du lait par *Lactococcus lactis*. *Le lait* .76 :13 – 24.

Kandler, O et Weiss, N. (1986). Genus *Lactobacillus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Edited by P. H. A. Sneath NSM., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. Baltimore: *Williams and Willkins*; Vol 2: 1209-1234.

Lane, C.N et Fox. P.F. (1996). Contribution of starter and added lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *Int. Dairy*, J 6: 715-728.

Larpent, J.P., Larpentet Gourgeaud, M. (1990). Mémento technique de Microbiologie. *Tech. et Doc*, Lavoisier, Paris.

Law, J., etHaandrikman, A., (1997). Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria.*Int. Dairy J.* 7: 1-11.

Lee J.Y., Kim C.J et Kunz, B. (2006). Identification of lactic acid bacteria isolated from kimchi and studies on their suitability for application as starter culture in the production of fermented sausages. *Meat Sci.* 72: 437-445.

Leroy F. et De Vuyst L., (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry.*Tre.FoodSci. Technol.* **15** : 67-78.

Leveau, J.Y., Bouix M et De Roissart, H. (1991).La flore lactique (chapitre3) technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. *3Ed .Tech et Doc Lavoisier. Paris.*

Monnet, V., Chapot Chartier, M et Gripon, J.C., (1993). Les peptidases des lactocoques. Elsevier INRA lait 73. : 97-108.

Novel, G. (1993). Les bactéries lactiques in : Microbiologie industrielle; les microorganismes d'intérêt industriel. Ed Technique et Documentation, Lavoisier, 614 p.

Ogunbanwo, ST., Sanni, A.letOmilude, A.A. (2003). Characterization of lactobacilli in cheese.*Journal of dairy research*, 25, 431-438.

Orla-Jensen., (1919).The lactic bacteria.Hosled son.Copenhagen, 74: 131-142.

Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E et Kotzekidou, P. (2003) Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *MeatSci.* 65,859–867.

Petransxiene, D etLapied, L. (1981). Qualitébactériologique du laitet des produitslaitiers, *2 èmeed Tec. Et Doc. Lavoisier*, 135 - 204.

Pilet M.F., Magras C., Federigh M., (2005). Bactéries lactiques. *In* : bactériologie alimentaire (Federighi M.). *2e Ed., Economica.* Paris. 219-240.

Rodriguez J.M., Martínez M.I., Horn N. et Dodd H.M., (2003). Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **80** : 101-116.

Rogosa, M. Franklin J.G et Perry, K.D. (1961). Correlation of the vitamin requirements with cultural and biochemical characters of *Lactobacillus subsp.* *Journal of General Microbiology* 1961, 24:473– 482.

Ross, R.P., Galvin, M., McAuliffe, O., Morgan, S.M., Ryan, M.P., Twomey, D.P., Meaney, W.J et Hill, C. (1999). Developing applications for lactococcal bacteriocins. *Antonie van Leeuwenhoek.* 76: 337-46.

Rouissat, L et Bensoltane, A. (2006). Physico-chemical, microbiological and biotechnological studies of lactic acid bacteria isolated from ewe's milk of Algerian tow breeds (Ouled Djellal and El Hamra). *Egypt. J. App. Sci.* 21: (2b), 567-582.

Salminen, S. Deighton, M.A., Benno, Y et Gorbach, S.L. (1998). Lactic acid bacteria in health and disease. In *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*, 2nd ed. Edited by Salminen SVWA, eds.; 1998:211–253.

Samona, S et Robinson, R. K. (1991). Enumeration of bifidobacteria in dairy products. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 44, 64–66.

Sandine, W. E. (1988). New nomenclature of the non straped lactic acid bacteria. *Biochimie* 70 : 519 - 522 .

Scannell, A.G.M., Schwarz, G., Hill, C., Ross, R.P et Arendt, E.K., 2001. Pre-inoculation enrichment procedure enhances the performance of bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* meat starter culture. *Int. J. Food Microbiol.* 64: 151-159.

Scardovi, V. (1986). *Bifidobacterium oenus* (ORLA J., 1924) in Bergey's Manual of Systematic bacteriology.

Schmitt, P., Diviès, C et Merlot, C. (1990). Utilization of citrate by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *crémoris* In continious culture . *Biotechnol. Let.* 12 (2) : 127 - 130 .

Schnürer, J., et Magnusson, J., 2005. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Food Sc. Technol.* 16 : 70-78.

Serhan M., Cailliez-Grimal C., Borges F., Revol-Junelles A.M., Hosri C. et Fanni J., (2009). Bacterial diversity of Darfiyeh, a Lebanese artisanal raw goat's milk cheese. *Food Microbiol.* 26 : 645-652.

Shirai .K, Guerrero .I, Huerta .S, Saucedo .G, Castillo. A, O Gonzalez .R et George M. (2001). Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation Hall. *Enzyme and Microbial Technology*: 446–452.

Stackebrandt, E et Goebel, B.M., (1994). Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 846-849.

Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A., Kampfer, P., Maiden, M.C., Nesme, X., Rossello-Mora, R., Swings, J., Truper, H.G., Vauterin, L., Ward, A.C et Whitman, W.B. (2002). Report of the ad-hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1043-1047.

Starenburg M. J. et hugenholtz T. C., (1991). Citrate fermentation by *Lactococcus* and *Leuconostoc*. *Appl. Environm. Microbiol.* 12 : 3535 - 3540 .

Streit F., Corrieu G. et Béal C., (2007). Acidification improves cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CF11. *J. Biotechnol.* 128 : 659-667.

Tagg, J.R., Dajani, A.S et Wanamaker, L.W. (1976). Bacteriocin of Gram positif bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40:702-756.

Thompson, J.K et Collins, M.A. (1989). Evidence for the conjugal transfer of a plasmid pVA797:pSA3 co-integrate into strains of *Lactobacillus helveticus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 9: 61-64.

Topisirovic L., Milan K., Djordje F., Natasa G., Ivana S et Jelena L. (2006). Potential of lactic acid bacteria isolated from specific naturel niched in food

production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 112: 230-235.

Tosukhowong A., Nakayama J., Mizunoe Y., Sugimoto S., Fukuda D. et Sonomoto K., (2005). Reconstitution and function of *Tetragenococcus halophilus* chaperonin 60 tetradecamer. *J. Biosci. Bioengin.* **99** : 30-37.

Zambunelli, C et Chiavari, C. (2002). Effect of lactic acid bacteria autolysis on sensorial characteristics of fermented food. *Food Technol Biotechnology*. **40** : 347-351.

Zhennai, Y. (2000). Antimicrobial compounds and Extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties. Academic Dissertation. Department of Food Technology, University of Helsinki, 61p.