



Faculté des sciences

Département de Biochimie

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme :
De DOCTORAT

*Isolement, caractérisation et purification de
bactériocines produites par des bactéries lactiques
autochtones: études physiologiques et biochimiques*

Option : Biochimie
Présentée Par

Mr. MECHAI Abdelbasset

Directrice de thèse : Mme KIRANE Djamila Prof. Université de BADJI- MOKHTAR
(Annaba)

Devant le jury :

Président :	Mr OUZROUT, R	Prof. Centre Universitaire d'el Tarf
Examineurs :	Mme ABASSI, N	Prof. Université BADJI- MOKHTAR (Annaba)
	Mr BENOUARETH, D	Prof. Université 45 mai 1945 (Guelma)
	Mr MERAD, T	MC. Université BADJI- MOKHTAR (Annaba)
	Mme CHETIBI, H	MC. Université BADJI- MOKHTAR (Annaba)

RESUME

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

Dans le présent travail, une collection de souches lactiques a été établie, elle comprend 132 souches isolées à partir de 48 échantillons de lait fermentés de façon artisanale et identifiées sur la base d'un certain nombre de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques.

La recherche de l'antagonisme bactérien dans le milieu solide a été réalisée suivant la méthode de double couche et la diffusion en puits dans des conditions qui éliminent l'effet de l'acide lactique et du peroxyde d'hydrogène. Parmi les 132 souches testées pour leurs activités antimicrobiennes, 92 sont confirmées productrices de bactériocines. Les résultats montrent que les souches productrices de bactériocines sont fréquemment isolées des produits laitiers. A partir de la collection des bactéries isolées, 5 souches appartenant aux espèces, *Lactobacillus. curvatus* LB65, *Lb. brevis* LB93, *Lb. plantarum* JB44, *Lactococcus. lactis* subsp. *lactis* RB22, et *Lactococcus. lactis* subsp. *lactis* JB31, ont été sélectionnées. Les bactériocines produites par les souches sélectionnées notamment (*Lactobacillus. curvatus* LB65, *Lb. brevis* LB93, *Lb. plantarum* JB44) possèdent de larges spectres d'activité avec un effet bactéricide et sont thermorésistantes et stables dans une large gamme de pH.

Il a par ailleurs été démontré que la souche *Lactobacillus. curvatus* LB65, produit une bactériocine dénommée curvaticine LB65. La procédure de purification de la curvaticine LB65 comporte une filtration du surnageant de culture de la souche productrice, suivie d'une précipitation au sulfate d'ammonium suivie d'une étape de chromatographie sur résine de QAE sephadex A-25 et une HPLC sur échangeur anionique DEAE. Le poids moléculaire de la bactériocine a été estimé à 3,2 KDa par l'électrophorèse en SDS-PAGE et la nature protéique de la bactériocine concentrée a été confirmée par la perte de son activité à la suite d'un traitement aux protéases, elle est également thermorésistante (121°C, 10min) et stable dans une large gamme de pH. Ces caractéristiques confèrent à la curvaticine LB65 un grand intérêt technologique dans le cas de son utilisation dans la biopréservation des aliments.

Mots clefs : bactéries lactiques, fermentation traditionnelle, Raib, Jben, Lben, bactériocines, biopréservation.

REMERCIEMENT

Louange à Dieu qui nous a donné l'esprit, la volonté, le courage et le savoir.

*Je dois l'aboutissement de cette thèse à de nombreuses personnes. Tout d'abord, je tiens à remercier ma directrice, **Mme KIRANE Djamila**, pour m'avoir permis de travailler sur un projet des plus intéressants où j'ai pu me familiariser avec différentes techniques de microbiologie et de biochimie. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour sa grande disponibilité et pour son écoute attentive. Et delà de sa compréhension, j'ai beaucoup apprécié la confiance qu'elle m'a toujours accordée, et grâce à laquelle j'ai bénéficié d'une grande liberté dans mon travail.*

*A **Mr OUZROUT, Rachid** (directeur du centre universitaire d'El Tarf) pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury, qu'il trouve ici l'expression de ma respectueuse reconnaissance.*

*J'adresse également mes remerciements à mes anciens professeurs **Mme. CHETTIBI Houria**, **Mme BOUTEFNOUCHET Nafissa** et **Mr. MERAD Tarek** (université de Badj-Mokhtar Annaba) pour m'avoir fait l'honneur de juger mon travail ainsi qu'à **Mr. BENOUARETH Djamel Eddine** (université de Guelma) pour sa participation au jury de thèse.*

*J'adresse aussi mes sincères gratitudes au directeur du laboratoire central de l'université d'Aine Shams (Egypte) **Prof. IBRAHIM Hassan Kamel** de m'avoir bien accueilli au sein de son établissement, où une bonne partie de mes travaux expérimentaux a été réalisée*

*Je remercie également **Dr GAMEL ABASSE**, responsable de l'unité spectroscopie de masse (laboratoire central d'Aine Shams), pour son aide et son accueil chaleureux au laboratoire, ainsi que **Dr BOUTHEINA Saïd Shaabane** pour son assistance et sa participation au bon déroulement des analyses par la technique d'électrophorèse en SDS-PAGE.*

*L'aide des personnels du laboratoire de biologie moléculaire (université Aine Shams) a aussi été grandement appréciée. Je remercie **Dr Wagdi Salah** qui m'a assisté dans la chromatographie (HPLC)*

Enfin, je souhaite remercier ma famille pour leur soutien inconditionnel et plus particulièrement Manel pour son incommensurable patience.

DEDICACES

A mes très chers parents ;

A mes sœurs ; FAIROUZ, KALTOUM MAYA et AZIZA

A mes frères: A/HAKIM, A/WAHAB et A/NOUR

A ma petite famille : Manel et Taha abderrahim

A tous ceux qui m'ont aidé dans mes études particulièrement :

M^r MECHAI M; Mr YENDJAH, L et M^r ZIAT,A

A tous mes proches, mes amis et tous ceux qui m'aiment.

Tous mes amis d'enfance et compagnons de tous les instants (Abderrahman , Ali et Samir)

A tous les habitants de mon petit village (TIFFECH)

ملخص

تلعب بكتيريا حمض اللاكتيك دورا جوهريا في صناعة المواد الغذائية المتخمرة فهي تحسن المذاق, المظهر الخارجي والسلامة الميكروبيولوجية للمنتوج الغذائي . تنتج بكتيريا حمض اللاكتيك العديد من المركبات ذات التأثير المضاد للبكتيريا مثل الأحماض العضوية, فوق أكسيد الهيدروجين, ثنائي الاسيتيل و البكتريوسينات .

في هذا العمل, مجموعة من سلالات بكتيريا حمض اللاكتيك تم تشكيلها, تحتوي هذه المجموعة على 132 سلالة معزولة من 48 عينة من الحليب المخمر بالطريقة التقليدية . لقد تم تصنيف السلالات وفق عدد من الخصائص المرفولوجية, الفيزيولوجية و البيوكيميائية.

من مجموع 132 سلالة بكتيرية تم فحصها بحثا عن النشاط المضاد للبكتيريا و باستعمال الطريقتين؛ ثنائية الطبقة و الانتشار في الجيلوز , 92 سلالة أثبتت إنتاجها لمواد ذات تأثير ضدي على البكتيريا, في حين البحث عن النشاط الضدي تحت شروط تقصي تأثير الأحماض العضوية و فوق أكسيد الهيدروجين سمح بانتقاء خمسة سلالات منتجة للبكتريوسينات وتنتمي للأنواع؛ *Lc. lactis subsp lactis* RB22 , *Lb. curvatus* LB65 *Lb. brevis* LB93, *Lb. plantarum* JB44, *Lc. lactis subsp. lactis* JB31 .

إن البكتريوسينات المنتجة من قبل السلالات الخمسة ذات طبيعة بروتينية و تمتلك مجالات واسعة من النشاط ضدي موجه خاصة ضد البكتيريا الموجبة لصبغة غرام. البكتريوسينات المعزولة تبدي مقاومة للحرارة (أكبر من 100م) و مستقرة في مجال واسع من الـ pH محصور بين 2 و 11.

من جهة أخرى تم إثبات أن السلالة *Lactobacillus curvatus* LB65 تنتج بكتريوسين تمت تسميته *curvaticine* LB65 و شملت طريقة تنقية هذا البكتريوسين على المراحل؛ ترشيح الخلاصة البكتيرية , الترسيب باستعمال أملاح كبريتات الامونيوم متبوعة بعملية الميز الغشائي, كروماتوغرافيا على عمود QAE sephadex A-25 و أخيرا كروماتوغرافيا ذات الأداء العالي على عمود التبادل الأيوني DEAE . مختلف مراحل التنقية سمحت برفع النشاط النوعي للبكتريوسين المعزول من 16,39 إلى 4266,66 وحدة/مغ مع مردود نهائي يساوي 0,4 % .

لقد تم تقدير الوزن الجزيئي للبكتريوسين ب 3,2 كيلو دالتون و ذلك باستعمال تقنية الرحلان الكهربائي على هلام البولي اكريلاميد بوجود مادة SDS. الطبيعة البروتينية للبكتريوسين تم إثباتها باستعمال إنزيمات تحليل البروتين . البكتريوسين المعزول مقاوم للحرارة (121 دم /10 د) و ثابت في مجال واسع من الـ pH . إن هذه الخصائص تكسب البكتريوسين المعزول أهمية بالغة و ذلك عند استعماله كمادة حافظة حيوية في المواد الغذائية.

الكلمات الدالة: بكتيريا حمض اللاكتيك, الحليب المخمر تقليديا, البكتريوسين, الحفص الحيوي.

RESUME

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

Dans le présent travail, une collection de souches lactiques a été établie, elle comprend 132 souches isolées à partir de 48 échantillons de produits laitiers fermentés de façon artisanale et identifiées sur la base d'un certain nombre de caractères phénotypiques, physiologiques et biochimiques.

Sur un total de 132 souches testées pour leurs activités antimicrobiennes par les deux méthodes ; de double couche et celle de diffusion en gélose, 92 sont confirmées productrices des substances antimicrobiennes, cependant la recherche de l'activité antimicrobienne dans des conditions qui éliminent l'effet des acides organiques et du peroxyde d'hydrogène a permis de cribler 5 souches bactériocinogènes appartenant aux espèces ; *Lb. curvatus* LB65, *Lb. brevis* LB93, *Lb. plantarum* JB44, *Lc. lactis* subsp. *lactis* RB22, et *Lc. lactis* subsp. *lactis* JB31 . Les bactériocines produites par les 5 souches sélectionnées sont de nature protéique et possèdent de larges spectres d'activité dirigée notamment contre les bactéries Gram+. Elles sont thermorésistantes (plus de 100°C) et stables dans une large gamme de pH comprise entre 2 et 11.

Nous avons par ailleurs démontré que la souche *Lactobacillus. curvatus* LB65, produit une bactériocine dénommée curvaticine LB65. La procédure de purification de la curvaticine LB65 comporte une filtration du surnageant de culture de la souche productrice, une précipitation au sulfate d'ammonium suivie d'une dialyse, une étape de chromatographie sur résine de QAE sephadex A-25 et une HPLC sur échangeur anionique DEAE. Les étapes de purification réalisées ont permis de faire passer l'activité spécifique de la bactériocine de 16,39 à 4266,66 U.A/mg, avec un rendement final de 0.4%. Le poids moléculaire de la bactériocine a été estimé à 3,2 KDa par l'électrophorèse en SDS-PAGE et la nature protéique de la bactériocine concentrée a été confirmée par la perte de son activité à la suite d'un traitement aux protéases, elle est également thermorésistante (121°C, 10 min) et stable dans une large gamme de pH. Ces caractéristiques confèrent à la curvaticine LB65 un grand intérêt technologique dans le cas de son utilisation dans la biopréservation des aliments.

Mots clefs : bactéries lactiques, lait fermenté traditionnellement, bactériocines, biopréservation,

SUMMARY

Lactic acid bacteria play an important role in food fermentation processes. They contribute to improving the taste, appearance and microbiological safety of food. These bacteria produce a variety of antimicrobial compounds such as organic acids, hydrogen peroxide, the diacetyl and bacteriocins.

In this work, a collection of lactic strains has been established, it includes 132 strains isolated from 48 samples of traditional fermented milk products and identified on the basis of a number of phenotypic, physiological and biochemical characters.

The search for bacterial antagonism in the solid medium was performed using the method of spot and distribution of wells under conditions that eliminate the effect of lactic acid and hydrogen peroxide. From 132 strains tested for their antimicrobial activities, 92 are confirmed producing bacteriocins. Among bacteriocinogenes strains, 5 strains of the species ; *Lb. curvatus* LB65, *Lb. brevis* LB93, *Lb. plantarum* JB44, *Lc. lactis* subsp. *RB22 lactis*, and *Lc. lactis* subsp. *lactis* JB31, were selected. Bacteriocins produced by the 5 selected strains are protein in nature and have broad spectra of activity directed particularly against Gram + bacteria. They are heat stable (over 100 ° C) and stable in a wide range of pH between 2 and 11.

We have also demonstrated that *Lb. curvatus* LB65, produces a bacteriocin called curvaticine LB65. The procedure for purification of curvaticine LB65 has a filtration of culture supernatant of the strain producing a precipitation of ammonium sulfate followed by dialysis, chromatography QAE Sephadex A-25 and HPLC on exchanger DEAE anion column. The purification steps carried out have allowed to increase the specific activity of the bacteriocin from 16.39 to 4266.66 AU / mg, with a final yield of 0.4%. The molecular weight of the bacteriocin have been estimated at 3.2 KDa by SDS-PAGE electrophoresis, and the pertinacious nature of the concentrated bacteriocin was confirmed by the loss of its activity after treatment with proteolytic enzymes , it is also heat resistant (121 ° C, 10 min) and stable in a wide range of pH. These features give the curvaticine LB65 a great technological interest in the case of its use in the biopreservation food.

Keywords: lactic acid bacteria, Traditional fermented milk, bacteriocins, Biopreservation,

REMERCIEMENTS

Louange à Dieu qui nous a donné l'esprit, la volonté, le courage et le savoir.

*Je dois l'aboutissement de cette thèse à de nombreuses personnes. Tout d'abord, je tiens à remercier ma directrice, **Mme KIRANE Djamila**, pour m'avoir permis de travailler sur un projet des plus intéressants où j'ai pu me familiariser avec différentes techniques de microbiologie et de biochimie. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour sa grande disponibilité et pour son écoute attentive. Et delà de sa compréhension, j'ai beaucoup apprécié la confiance qu'elle m'a toujours accordée, et grâce à laquelle j'ai bénéficié d'une grande liberté dans mon travail.*

*A **Mr. OUZROUT, Rachid** (centre universitaire d'EL TARF) pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury, qu'il trouve ici l'expression de ma respectueuse reconnaissance.*

*J'adresse également mes remerciements à mes anciens professeurs **Mme. CHETTIBI Houria**, **Mme BOUTEFNOUCHET Nafissa** et **Mr. MERAD Tarek** (université de Badj-Mokhtar Annaba) pour m'avoir fait l'honneur de juger mon travail ainsi qu'à **Mr. BENOUARETH Djamel Eddine** (université de Guelma) pour sa participation au jury de thèse.*

*J'adresse aussi mes sincères gratitude au directeur du laboratoire central de l'université d'Aine Shams (Egypte) **Prof. IBRAHIM Hassan Kamel** de m'avoir bien accueilli au sein de son établissement, où une bonne partie de mes travaux expérimentaux a été réalisée*

Je remercie également Dr GAMEL ABASSE, responsable de l'unité spectroscopie de masse (laboratoire central d'Aine Shams), pour son aide et son accueil chaleureux au laboratoire, ainsi que Dr BOUTHEINA Saïd Shaabane pour son assistance et sa participation au bon déroulement des analyses par la technique d'électrophorèse en SDS-PAGE.

L'aide des personnels du laboratoire de biologie moléculaire (université Aine Shams) a aussi été grandement appréciée. Je remercie Dr Wagdi Salah qui m'a assisté dans la chromatographie (HPLC)

Enfin, je souhaite remercier ma famille pour leur soutien inconditionnel et plus particulièrement Manel pour son incommensurable patience.

DEDICACES

A mes très chers parents ;

A mes sœurs ; FAIROUZ, KALTOUM MAYA et AZIZA

A mes frères : A/HAKIM, A/WAHAB et A/NOUR

A ma petite famille : Manel et Taha abderrahim

A tous ceux qui m'ont aidé dans mes études particulièrement :

Mr. MECHAI M; Mr YENDJAH, L et Mr. ZIAT, A

A tous mes proches, mes amis et tous ceux qui m'aiment.

Tous mes amis d'enfance et compagnons de tous les instants (Abderrahman, Samir et Ali)

A tous les habitants de mon petit village (TIFFECH)

Liste des tableaux

Tableau 01 :	Caractéristiques différentielles des bactéries lactiques (Dérivée à partir de Axelsson, 1998 ; Leisner <i>et al.</i> , 2000)	09
Tableau 02 :	Classification des groupes du genre <i>Lactobacillus</i> (Axellsson, 1998).....	14
Tableau 03 :	Utilisations des bactéries lactiques dans la fermentation alimentaires et exemples des espèces prédominantes (d'après McKay et Baldwin, 1990).....	23
Tableau 04 :	Effets positifs des probiotiques sur la santé (effets probables ou suspectés) (Moroni, 2007)	25
Tableau 05 :	Les bactériocines produites par différentes espèces de bactéries lactiques (Parada <i>et al.</i> , 2007).	31
Tableau 06 :	Classification des bactériocines produites par les bactéries lactiques selon Heng et Tagg, (2006).	40
Tableau 07 :	Lantibiotiques de type A (Morisset <i>et al.</i> , 2005).	41
Tableau 08 :	Lantibiotique de type B.....	42
Tableau 09 :	Bactériocines de sous-classe IIa (Morisset <i>et al.</i> , 2005)	43
Tableau 10 :	Bactériocines non modifiées à deux composants produites par des bactéries lactiques (Morisset <i>et al.</i> , 2005)	43
Tableau 11 :	Bactériocines de sous-classe IIc produites par des bactéries lactiques (Morisset <i>et al.</i> , 2005).	44
Tableau 12 :	Bactériocines de sous-classe III produites par des bactéries lactiques (Morisset <i>et al.</i> , 2005).....	45
Tableau 13 :	Mode d'action des bactériocines (Morisset <i>et al.</i> , 2005).	56
Tableau 14 :	Répartition d'échantillonnage	67
Tableau 15 :	Les souches bactériennes utilisées et leurs origines.....	77
Tableau 16 :	Identification des souches appartenant au genre <i>Lactobacillus</i>	89
Tableau 17 :	Identification des souches appartenant aux genres <i>Lactococcus</i> , <i>Enterococcus</i> et à l'espèce <i>Streptococcus thermophilus</i>	95
Tableau 18 :	Titrage de l'activité antimicrobienne présente dans l'extrait de culture (pH 6) des souches isolées.....	102
Tableau 19 :	Effets des traitements enzymatiques sur les substances antibactériennes produites par les souches isolées (tests effectués avec <i>L. monocytogenes</i> ATCC7644 comme souche indicatrice).....	105

Tableau 20 :	Sabilité des substances antimicrobiennes étudiées aux différents traitements thermiques.....	106
Tableau 21 :	Stabilité des substances antimicrobiennes des souches sélectionnées aux différents pH.....	106
Tableau 22 :	Effet du pH combiné au traitement thermique sur la stabilité des bactériocines....	107
Tableau 23 :	Effet des agents surfactants sur la stabilité des bactériocines.....	107
Tableau 24 :	Spectres d'activité des substances antibactériennes produites par les différentes bactéries isolées.....	110
Tableau 25 :	Récapitulation des caractéristiques des bactériocines produites par les souches bactériennes sélectionnées.....	124
Tableau 26 :	Rendement des étapes de purification de la curvaticuine MB65. La fraction FI correspond au surnageant centrifugé et concentré, la fraction FII à la fraction FI précipité par le sulfate d'ammonium ; la fraction FIII à la partie de la fraction FII qui s'est désorbé d'une colonne QAE sephadex A-25 avec 0.5 M de NaCl, et la fraction FIV à un pic actif résultant d'une injection de la fraction FIII sur une colonne échangeuse anionique DEAE.....	127
Tableau 27 :	Effets des différents traitements sur la curvaticine LB65 (tests effectués avec <i>L. monocytogenes</i> ATCC7644 comme souche indicatrice)	130

Liste des figures

Figure 1 :	Arbre consensus, basé sur l'analyse comparative des séquences ARNr, montrant les principaux groupes phylogénétiques de bactéries lactiques à faible mol % G+C et les genres Gram-positif nonreliés <i>Bifidobacterium</i> et <i>Propionibacterium</i> (Holzapfel <i>et al.</i> , 2001)	07
Figure 02:	Clef d'identification des bactéries lactiques (Montel <i>et al.</i> , 1991)	18
Figure 03 :	Mécanisme d'induction de l'expression des gènes et de la biosynthèse de bactériocines (Nissen-Meyer <i>et al.</i> , 1997).....	50
Figure 04 :	Organisation génétique des groupes de gènes de quelques bactériocines de bactéries Gram- positives. (Jack <i>et al.</i> ,1995).	52
Figure 05 :	Représentation schématique d'un modèle de structure (a) des bactériocines de classe IIa et de leur mode d'action au niveau de la membrane cellulaire cible: (b) interactions possibles de chaque domaine avec la surface membranaire; (c) Insertion des bactériocines et formation des pores hydrophiles. La face hydrophobe du peptide est désignée par une couleur foncée et la face hydrophile plus claire (d'après Ennahar <i>et al.</i> , 2000b).	54
Figure 06 :	Protocole d'isolement, de purification et d'identification des souches lactiques.....	69
Figure 07 :	Schéma représentant les méthodes de détection de l'antagonisme bactérien, adaptées d'après la méthode de détection directe de Barefoot et Klaenhammer (1983) (a) et la méthode des puits de Tagg et McGiven (1971) (b)	79
Figure 08 :	Présentation schématique du protocole d'extraction et de purification de la curvaticine LB65.	85
Figure 09a :	Révélation de l'activité antimicrobienne des souches sélectionnées par la méthode de diffusion en gélose. 1 : <i>Lb. plantarum</i> JB44, 3 : <i>Lb. brevis</i> LB93, 3 : 09 : <i>Lb. curvatus</i> LB65, 10 : <i>Lc.lactis</i> subsp. <i>lactis</i> JB31, 4 : <i>Lc.lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RB22.....	101
Figure 09b :	Révélation de l'inhibition (méthode de diffusion en puits) de <i>L. monocytogenes</i> ATCC7644 par les extraits actifs des souches bactériocinogènes. 1 : <i>Lb. plantarum</i> JB44, 2 : <i>Lb. brevis</i> LB93, 3 : <i>Lb. curvatus</i> LB65, 4 : <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> JB31, 5 : <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RB22	101
Figure 10 :	Cinétique de croissance de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 en présence de l'extrait de culture de <i>Lb. brevis</i> LB93 (■) et en absence de l'extrait de culture actif (▲).....	112
Figure 11 :	Comportement de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 en présence de l'extrait de culture	

	de <i>Lb. curvatus</i> LB65 (■) et en absence de l'extrait (▲).....	115
Figure 12 :	Cinétique de croissance de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 en présence de l'extrait de culture de <i>Lb. plantarum</i> JB44 (■) et en absence de l'extrait de culture actif (▲).....	117
Figure 13 :	Comportement de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7466 en présence de l'extrait de culture de <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> JB31 (■) et en absence de l'extrait de culture actif (▲).....	120
Figure 14:	Cinétique de croissance de <i>L. monocytogenes</i> ATCC7644 en présence de l'extrait de culture de <i>Lc .lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RB22 (■) et en absence de l'extrait de culture actif (▲)	122
Figure 15:	Chromatogramme de la purification par échange anionique, sur résine de QAE sephadex A-25 de la curvaticine LB65. Le tampon d'élution est Tris-HC 1,50 mM pH 8.8, le débit est maintenu à 1 ml par minute. L'élution est suivie par lecture de l'absorbance à 280 nm (—), mesure de l'activité inhibitrice par la méthode de la dilution critique en U.A/ml (■ ■ ■).....	128
Figure 16 :	Chromatogramme de la purification par HPLC sur échangeur anionique DEAE de la curvaticine LB65. L'élution est suivie par lecture de l'absorbance à 220 nm (—), mesure de l'activité inhibitrice par la méthode de la dilution critique en U.A/ml (■ ■ ■).....	129
Figure 17 :	Estimation du poids moléculaire de la la curvaticine LB65 par SDS-PAGE. Le marqueur de poids moléculaire Broad Range Prestained SDS-PAGE Standards de BioRad (ligne 1), la fraction (FI) (surnageant précipité par les sulfate d'ammonium) (ligne 2) ; la fraction (FII) après passage sur la colonne QAE sephadex A-25 (ligne 3) ; la fraction (FIII) après passage sur la colonne échangeuse anionique DEAE (lignes 4 et 5).....	131

Liste des abréviations

<p>Ac : acide</p> <p>ADH : Arginine dihydrolase</p> <p>ATCC : American Type of culture collection</p> <p>BL/LAB : Bactéries Lactiques/Lactic Acid Bacteria</p> <p>CFU/ml : Unité formant colonie par millilitre</p> <p>CMI : concentration minimale inhibitrice</p> <p>DEAE : diéthylaminoéthyl</p> <p>EDTA : acide éthylènediamine tétra acétique</p> <p>GRAS : Generally recognized as safe</p> <p>GMP: Good manufacturing practice</p> <p>HPLC : high performance liquid chromatography ; chromatographie liquide à haute performance</p> <p>HACCP : Hazard Analysis Critical Control Point</p> <p>kb : kilo paires de bases</p> <p>KDa : kilo dalton</p> <p>LA : Lactobacilli Agar</p> <p>M : molaire</p> <p>ml : millilitre</p> <p>SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</p> <p>FDA: Food and drug Administration,</p> <p>ssp/ subsp : sous-espèce</p> <p>U. A/ ml: unités arbitraires d'activité par millilitre</p> <p>TSA : (gélose tryptone soja)</p> <p>TSYAE : (bouillons tryptone soja + 0,6% d' extrait de levure)</p> <p>MI7: Milieu complexe à base d'extrait de viande, de peptone et d'extrait de levure.</p> <p>GN : gélose nutritive</p> <p>BHI: Brain Heart Infusion (Infusion de coeur et de cervelle)</p>	<p>NaCl: chlorure de sodium</p> <p>NaOH : hydroxyde de sodium</p> <p>pb : paires de bases</p> <p>QAE : aminoéthyl quaternaire</p> <p>µg/ml : microgramme par millilitre</p> <p>MRS :de Man, Rogosa et scharpe</p> <p>mDAP : acide meso-diaminopimelique</p> <p>IRTF :infra-rouge à transformée de fourier</p> <p>PCR : Polymerase Chain Reaction</p> <p>PM : poids moléculaire</p> <p>Abréviations utilisé pour les genres microbiens</p> <p><i>Cb</i> : <i>Carnobacterium</i></p> <p><i>En</i> : <i>Enterococcus</i></p> <p><i>L</i> : <i>Lesteria . monocytogenes</i></p> <p><i>Lb</i> : <i>Lactobacillus</i></p> <p><i>Lc</i> : <i>Lactococcus</i></p> <p><i>Ln</i> : <i>Leuconostoc</i></p> <p><i>S</i> : <i>Sporolactobacillus</i></p> <p><i>Sc</i> : <i>Streptococcus</i></p> <p><i>P</i> : <i>Pediococcus</i></p> <p><i>W</i> : <i>Weissella</i></p>
---	--

TABLE DES MATIÈRES

	page
RÉSUMÉ (en Arabe).....	i
RÉSUMÉ (en français).....	ii
RÉSUMÉ (en Anglais).....	iii
REMERCIEMENTS.....	iv
DEDICACES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES ABREVIATIONS.....	xi
TABLE DES MATIÈRES.....	xii
INTRODUCTION GENERALE	01

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I TAXONOMIE ET CLASSIFICATION DES BACTERIES LACTIQUES

1. Les bactéries lactiques : historique et définition.....	04
2. Caractéristiques générales des bactéries lactiques.....	04
3. Taxonomie et relations phylogéniques entre genres de bactéries lactiques	05
4. Classification des bactéries lactiques.....	07
4.1. Classification des genres	07
4.1.1. Les genres <i>Enterococcus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Streptococcus</i> et <i>Vagococcus</i>	08
4.1.2. Les genres <i>Aerococcus</i> , <i>Pediococcus</i> et <i>Tetragenococcus</i>	11
4.1.3. Le genre <i>Leuconostoc</i>, <i>Oenococcus</i> et <i>Weissella</i>.....	12
4.1.4. Le genre <i>Lactobacillus</i> et <i>Carnobacterium</i>.....	13

CHAPITRE II METHODES D'IDENTIFICATION ET DE CLASSIFICATION DES BACTERIES LACTIQUES.....

1. Méthodes d'identification des bactéries lactiques.....	16
1.1. Analyse phénotypique.....	16
1.2. Méthodes chimio-taxonomiques.....	17

1.2.1. Analyse des protéines cellulaires solubles par électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE).....	17
1.2.2. Analyse des acides gras de paroi par chromatographie en phase gazeuse.....	17
1.3. Méthodes étudiant la structure des acides nucléiques.....	19
1.3.1. Contenu en guanine et cytosine de l'ADN chromosomique.....	19
1.3.2. Hybridation ADN-ADN	19
1.3.3. Séquençage de l'ARNr 16S	20

CHAPITRE III POTENTIELS INDUSTRIELS ET TECHNOLOGIQUES DES BACTERIES LACTIQUES..... 21

1. Utilisations industrielles des bactéries lactiques	21
2. rôles probiotiques des bactéries lactiques	23
2.1. Critères de sélection des souches probiotiques	23
2.2. Les probiotiques et leurs effets bénéfiques sur la santé	25
3. Propriétés inhibitrices des bactéries lactiques et la biopréservation des aliments	27
3.1. La bio-conservation par les bactériocines des bactéries lactiques.....	30
3.2. Les stratégies d'utilisation des bactériocines dans les aliments	34
3.2.1. Ajout de bactéries lactiques bactériocinogènes	34
3.2.2. Ajout de bactériocines pures ou semi-purifiées	35
3.2.3. Ajout de bio-ingrédient concentré à base de bactériocine	35
3.3. Facteurs influençant l'action des bactériocines de bactéries lactiques.....	35

CHAPITRE IV LES BACTERIOCINES..... 37

1. Bref historique sur les bactériocines	37
2. Définition des bactériocines	38
3. Classification des bactériocines.....	39
3.1. Classe I- lantibiotiques :.....	40
3.1.1. Lantibiotique de type A	40
3.1.1.2. Lantibiotiques de type B	41
3.2. Classe II- peptides non modifiés	42

3.2.1. Sous-classe IIa.....	42
3.2.2. Sous-classe IIb.....	43
3.2.3. Sous- classe IIc.....	44
3.3. Classe III.....	45
3.4. Classe IV.....	45
4. Purification des bactériocines	45
5. Méthodes de détection et de quantification.....	47
5.1. Méthodes traditionnelles.....	47
5.2. Méthodes immunoenzymatiques.....	48
6. Génétique et biosynthèse des bactériocines	49
6.1. Biosynthèse des bactériocines	49
6.2. Les déterminants génétiques associés à la biosynthèse des bactériocines	50
7. Mode d'action des bactériocines	52
8. Applications industrielles des bactériocines de bactéries lactiques	56
8.1. Protection alimentaire	57
8.2. Application des bactériocines dans le secteur de la santé	59
9. Problème de résistance aux bactériocines.....	60

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES.....	63
I. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES SOUCHES LACTIQUES.....	63
1. Matériel biologique.....	63
1.1. Présentation des échantillons.....	63
1.1.1. Le Leben.....	63
1.1.2. Le Raib	64
1.1.3. Le fromage traditionnel le jben	64
1.1.3.1. Technologie traditionnelle	65
1.1.3.2. Technologie semi-industrielle	65
1.1.3.3. Caractéristiques microbiologiques	66
1.2. Prise des échantillons	66

1.3. Milieux de culture	67
2. Méthodes	68
2.1. Isolement, purification et conservation des souches	68
2.2. Tests d'identification.....	70
II. ETUDE DES ACTIVITES ANTIMICROBIENNES DES SOUCHES ISOLEES.....	77
1. Souches bactériennes et leurs origines	77
2. criblage des souches à activité antimicrobienne	78
2.1. Méthode de détection directe	78
2.2. Méthode de détection indirecte.....	79
2.3. Méthode de diffusion en gélose.....	80
3. Mesure de l'activité antimicrobienne	80
4. Caractérisation des substances antibactériennes produites par les souches lactiques bactériocinogènes.....	80
4.1. Élimination de la possibilité d'antagonisme par les acides organiques et le peroxyde d'hydrogène	80
4.2. Élimination de la possibilité d'antagonisme par les bactériophages.....	81
4.3. Hydrolyse enzymatique de la substance antibactérienne.....	81
4.4. Spectre d'activité antibactérienne.....	81
4.5. Cinétique et mode d'action	82
5. Influences des paramètres (pH, température) sur les activités antimicrobiennes des souches bactériocinogènes	82
5.1. Influence du pH sur la stabilité des bactériocines.....	82
5.2. Influence de la température sur la stabilité des bactériocines.....	82
5.3. Effet combiné de la température et du pH sur la stabilité des bactériocines.....	83
6. Effet des agents surfactants sur l'activité des bactériocines.....	83
III. PURIFICATION DE LA CURVATICINE LB65 PRODUITE PAR <i>Lb. curvatus</i> LB	
65.....	83
1. Concentration de la curvaticine LB65 produite par <i>Lb. curvatus</i> LB65 par précipitation	

par le sulfate d'ammonium.....	83
2. Étapes de purification de la curvaticine LB65 produite par <i>Lb. curvatus</i>	84
2.1. Chromatographie sur échangeur anionique à pression normale (QAE sephadex A-5).....	84
2.2. Chromatographie HPLC sur échangeur anionique DEAE.....	86
3. Le dosage des protéines totales.....	86
4. Évaluation des propriétés de la curvaticine LB65.....	86
5. Détermination du poids moléculaire par l'électrophorèse (SDS-PAGE).....	87
CHAPITRE II RESULTATS ET DESCUSSION.....	88
1. Isolement et identification des souches lactiques.....	88
1.1. Examen macroscopique	88
1.2. Examen microscopique	88
1.3. Identification des souches appartenant au genre <i>Lactobacillus</i>	88
1.3.1. <i>Lactobacillus</i> groupe I	91
1.3.2. <i>Lactobacillus</i> groupe II	92
1.3.3. <i>Lactobacillus</i> groupe III	93
1.4. Identification des souches appartenant au genre <i>Lactococcus</i>	94
1.4.1 . L'espèce <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	97
1.4.2. L'espèce <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	97
1.4.3. L'espèce <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>	98
1.5. Identification des souches appartenant à l'espèce <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> :.....	99
1.6. Espèces du genre <i>Enterococcus</i>	99
1.6.1. <i>Entérocooccus faecalis</i>	99
2. Sélection des souches bactériocinogènes et caractérisation des bactériocines produites....	100
2.1. Titrage de l'activité antimicrobienne	102
3. Identification des substances antibactériennes comme étant des bactériocines	102
3.1. Le facteur antibactérien produit par la souche <i>Lb. brevis</i> LB93.....	104
3.1.1. Caractérisation biochimique et physicochimique	104
3.1.2. Spectre d'activité	108

3.1.3. Mode d'action.....	111
3. 2. Facteur antibactérien produit par la souche <i>Lb. curvatus</i> LB65.....	113
3.2.1. Caractérisation biochimique et physicochimique	113
3.2.2. Spectre d'activité	113
3.2.3. Mode d'action.....	114
3.3. Facteur antibactérien produit par la souche <i>Lb. plantarum</i> JB44.....	116
3.3.1. Caractérisation biochimique et physicochimique	116
3.3.2. Spectre d'activité	116
3.3.3. Mode d'action.....	117
3.4. Comparaison de la bactériocine produite par les souches sélectionnées de genre <i>lactobacillus</i> avec des bactériocines produites par d'autres souches de lactobacilles.....	118
3.5. Facteur antibactérien produit par la souche <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> JB31.....	119
3.5.1. Caractérisation biochimique et physicochimique	119
3.5.2. Spectre d'activité	119
3.5.3. Mode d'action.....	120
3. 6. Facteur antibactérien produit par la souche <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RB22.....	121
3.6.1. Caractéristique biochimique et physicochimique.....	121
3.6.2. Spectre d'activité	121
3.6.3. Mode d'action.....	121
3.7. Comparaison avec des bactériocines produites par d'autres souches de <i>Lc. lactis</i>	122
4. Nomenclature et classification des bactériocines produites par les souches sélectionnées	124
5. Purification de la la curvaticine LB65 produite par la souche <i>Lb. curvatus</i> LB65.....	126
6. Stabilité biochimique de la curvaticine LB65.....	130
7. Estimation du poids moléculaire de la curvaticine LB65.....	131
 CONCLUSION GENERALE.....	 132
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	 135
 ANNEXES.....	

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les aliments sont source d'énergie, de nutriments, de vitamines et de minéraux. Cependant, ils peuvent aussi être les vecteurs de transport pour de nombreux agents pathogènes causant des infections chez l'homme. L'industrie alimentaire est très préoccupée par la possibilité que des micro-organismes pathogènes soient transmis aux consommateurs par les aliments qu'elle produit et tente par tous les moyens d'empêcher cette propagation (Tahiri, 2007). Les règles d'hygiène strictes et les normes sévères associées à la transformation saine des aliments font partie de la culture de plusieurs entreprises du domaine alimentaire. Cependant, il est difficile de contenir entièrement tous les agents pathogènes. De plus, la grande disponibilité d'aliments prêts à manger avec une longue durée de conservation augmente les risques de contamination en procurant une plus longue période de croissance des micro-organismes contenus dans ces aliments (Dortu, 2008 ; Huss *et al.*, 2000).

Les moyens de lutte employés contre ces agents pathogènes font le plus souvent appel aux barrières microbiologiques traditionnelles tels que le sel, les nitrates et les sorbates. Cependant, les nouvelles tendances du marché montrent une réticence des consommateurs pour les additifs chimiques et le sel. De plus le consommateur favorise de plus en plus le recours aux produits naturels. Ainsi, des investigations récentes se sont orientées vers la lutte biologique qui consiste à valoriser les produits issus du métabolisme des bactéries lactiques ayant une activité antimicrobienne (Naghmouchi, 2007).

Les bactéries lactiques sont généralement reconnues comme étant saines, de statut "GRAS" (Generally Recognized As Safe) et jouent un rôle important dans la fermentation et la conservation des aliments, que ce soit en tant que microflore naturelle ou comme cultures ajoutées sous des conditions contrôlées. Elles sont largement employées dans la préparation de nombreux aliments fermentés (yaourts, laits fermentés, fromages, etc.). En plus de leur rôle technologique, la contribution la plus importante de l'ajout de ces souches au produit est l'amélioration de sa qualité (saveur, texture) et son innocuité par l'intermédiaire de l'allongement de sa durée de vie et de l'inhibition de la flore compétitive d'altération et des bactéries pathogènes (O'Sullivan *et al.*, 2002). Ces propriétés de conservation sont le résultat des propriétés inhibitrices des bactéries lactiques qui incluent la compétition pour les nutriments, les changements physico-chimiques du milieu, tels que l'acidification et la production de métabolites antimicrobiens. En effet, les bactéries lactiques ont la propriété de produire de nombreuses substances antimicrobiennes telles que les acides organiques (acide lactique), du peroxyde d'hydrogène, du CO₂, de l'acétylène, de

l'acétaldéhyde et des bactériocines (Ray et Daeschel, 1994; Ring et Gatesoupe, 1998; O'Sullivan *et al.*, 2002). Plusieurs revues et travaux de recherche rapportent le potentiel des bactéries lactiques utilisées comme cultures ajoutées pour inhiber des microorganismes pathogènes présents dans les aliments (Wessels et Huss, 1996; Stiles, 1996; Cintas *et al.*, 2001; Rodgers, 2001; O'Sullivan *et al.*, 2002; Katikou *et al.*, 2007), notamment l'inhibition de *L. monocytogenes* en présence de bactéries lactiques (Nilsson *et al.*, 1999; Richard *et al.*, 2004; Vaz-Velho *et al.*, 2005; Vescovo *et al.*, 2006).

Les bactériocines sont des peptides synthétisés par les ribosomes et elles possèdent une activité bactéricide ou bactériostatique envers d'autres micro-organismes (Klaenhammer, 1993). Ceci permet à la bactérie productrice de pouvoir éliminer certains compétiteurs potentiels présents dans son environnement. Certaines bactériocines ne sont pas uniquement efficaces envers des bactéries phylogéniquement semblables (Tagg *et al.*, 1976). Elles peuvent avoir un spectre d'activité étendu et sont en mesure d'affecter une grande variété de bactéries sans pour autant se limiter à celles qui lui sont semblables (Stevens *et al.*, 1991 ; Klaenhammer, 1993). A la suite de leurs travaux sur les colicines (bactériocines de bactéries Gram-), Tagg *et al.*, (1976) citent 5 critères requis pour qu'une substance chimique soit dénommée bactériocine : la présence d'une partie biologiquement active de nature protéique, un spectre d'activité inhibitrice étroit et centré sur les espèces homologues, un mode d'action bactéricide, l'adsorption à des récepteurs spécifiques et la nature plasmidique des déterminants génétiques codant pour la production de la bactériocine et pour l'immunité à celle-ci. Des études ultérieures ont montré que parmi les bactériocines produites par des bactéries Gram+, et spécialement parmi celles produites par des bactéries lactiques, les exceptions à ces critères sont nombreuses.

L'utilisation des bactériocines dans les aliments fut introduite par Hirsch et al en 1951 (Hirsch *et al.*, 1951) lorsqu'il démontra que la nisine était en mesure d'inhiber la croissance de *Clostridium* dans un fromage fait de lait pasteurisé. Cette découverte eut comme effet de propulser les études sur les bactériocines. En effet, grâce à l'activité anti-microbienne de leurs bactériocines, les bactéries productrices ont la capacité de diminuer la charge microbienne d'un aliment et donc de contribuer à leur innocuité. Malgré tout, seule la nisine est autorisée à ce jour comme additif alimentaire (Delves-Broughton, 1990). En effet, la nisine est la seule bactériocine à posséder le statut GRAS (Generally *Recognized as Safe*), décerné en 1988 par la FDA (Food and drug Administration, 1988) des États-unis.

Les bactéries productrices de bactériocines sont largement répandues dans la nature, elles ont été isolées de nombreuses sources telles que les produits laitiers (Ayad *et al.*, 2004; Aslim *et al.*, 2005), les saucissons fermentés (Herranz *et al.*, 2001; Noonpakdee *et al.*, 2003), les produits halieutiques (Ostergaard *et al.*, 1998), les produits végétaux (Uhlman *et al.*, 1992), l'ensilage (Vlaemynck *et al.*, 1994) et même le tractus gastro-intestinal des mammifères (Pattnaik *et al.*, 2005).

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de la diversité des bactéries lactiques productrices de bactériocines à travers la sélection de nouvelles bactéries de ce type dans les produits laitiers fermentés de façon artisanale.

A ce titre, les objectifs de cette recherche ont été les suivants :

- ⊕ Isoler, purifier et identifier des bactéries lactiques bactériocinogènes à partir des produits laitiers fermentés de façon artisanale
- ⊕ Recherche et criblage des bactériocines produites par les bactéries lactiques isolées, tout en déployant les moyens permettant d'optimiser leur production et leur détection.
- ⊕ Déterminer leurs propriétés physico-chimiques (thermosensibilité, sensibilité aux enzymes protéolytiques, glycolytique et lipolytiques, activité à différents pH, sensibilité aux détergents).
- ⊕ Établir le spectre d'activité des bactériocines contre différentes espèces de bactéries Gram+ et Gram-.
- ⊕ Le développement et l'optimisation d'un protocole de purification par les techniques chromatographiques d'une bactériocine produite par une souche lactique de notre collection ainsi que l'estimation de son poids moléculaire par la technique d'électrophorèse en SDS- PAGE

CHAPITRE I

TAXONOMIE ET CLASSIFICATION DES BACTÉRIES

LACTIQUES

1. Les bactéries lactiques : historique et définition

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

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

2. Caractéristiques générales des Bactéries Lactiques

La première définition de bactéries lactiques (BL), basée sur la capacité des bactéries de fermenter et de coaguler le lait, englobait les bactéries coliformes et lactiques. En 1901, Beijerinck observe que les lactobacilles sont des bactéries à Gram positif, ce qui séparera définitivement les bactéries lactiques (à Gram positif) des bactéries coliformes (Stiles et Holzapfel, 1997).

Les bactéries lactiques sont donc des bactéries à Gram positif qui convertissent le pyruvate en acide lactique pour régénérer le NAD^+ utilisé dans la glycolyse. A quelques exceptions près, elles partagent les caractéristiques suivantes : elles sont généralement immobiles, asporulées, anaérobies mais aérotoles. Pour se développer, elles ont besoin de sources de carbone organique (glucides fermentescibles) et de nombreuses bactéries lactiques ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés ou les peptides, les vitamines et les acides gras (Prescott *et al.*, 1999). Les bactéries lactiques peuvent avoir un métabolisme homofermentaire (plus de 90% des produits de fermentation est de l'acide lactique), hétérofermentaire facultatif (elles produisent de l'acide lactique ou de l'acide acétique) ou hétérofermentaire strict (elles produisent, en plus de l'acide lactique, de l'acide acétique ou de l'éthanol et du CO_2) (Vandamme *et al.*, 1996).

Les bactéries lactiques sont ubiquistes et on les trouve dans différentes niches écologiques comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses humaines et animales et dans le tractus digestif. Les bactéries lactiques utilisées dans l'alimentation sont considérées comme non pathogènes et se voient attribuer le qualificatif anglo-saxon d'organismes GRAS (Generally Regarded As Safe) (Adams et Marteau, 1995 ; Aguirre et Collins, 1993). Cependant, quelques membres du genre *Streptococcus* et *Enterococcus* ainsi que d'autres bactéries lactiques sont considérées comme pathogènes opportunistes (Aguirre et Collins 1993).

3. Taxonomie et relations phylogéniques entre genres de bactéries lactiques

Le groupe des bactéries lactiques ne peut pas être considéré comme un groupe phylogénétique. Elles appartiennent toutes au groupe des bactéries à Gram positif, mais si la plupart d'entre elles appartiennent au groupe des bactéries à Gram positif à bas G+C (phylum des Firmicutes), le genre *Bifidobacterium* appartient au groupe des bactéries à Gram positif à haut G+C (phylum des Actinomycètes) (Figure 1). Si les bifidobactéries sont phylogéniquement éloignées des BL *sensu stricto* (BL à bas G+C), elles sont tout de même traditionnellement incluses dans les BL car elles partagent certaines caractéristiques avec elles (elles produisent de l'acide lactique et sont utilisées dans les laits fermentés (Holzapfel *et al.*, 2001).

Selon Stiles et Holzapfel (1997) et Axelsson (1998), les bactéries lactiques englobent les genres suivants : *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*,

Enterococcus, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactosphaera*, *Vagococcus* et *Weisella*. Néanmoins, c'est surtout *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Weisella* et à grande échelle *Lactobacillus*, qui ont une certaine importance dans les aliments (Vandamme *et al.*, 1996). La relation phylogénétique entre les différents genres des bactéries lactiques est représentée dans la figure (01) et est basée sur la comparaison des séquences d'ARNr 16S. *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* et *Lactosphaera* sont étroitement apparentés les uns aux autres. *Lactococcus* et *Streptococcus* apparaissent comme relativement apparentés, alors que *Lactobacillus* est phylogénétiquement distinct.

Récemment 15 genres lactiques ont été décrits (*Abiotrophia*, *Dolosicoccus*, *Ermecoccus*, *Facklamia*, *Ignavigranum*, *Alkalibacterium*, *Allofustis*, *Desemzia*, *Granulicatella*, *Isobaculum*, *Marinilactobacillus*, *Trichococcus*, *Atopobacter*, *Paralactobacillus*, *Oscillospira*). Le genre *Lactosphaera* a été reclassé comme appartenant au genre *Trichococcus*. Parmi ces 15 nouveaux genres, seul *Paralactobacillus* est d'origine alimentaire. En effet, l'espèce qui compose ce genre, en l'occurrence *Paralactobacillus selangorensis*, a été isolée d'un ingrédient malaysien (Leisner *et al.*, 2000).

En outre, il est à signaler que le nombre d'espèces lactiques d'origine alimentaire ne cesse d'augmenter. Très récemment deux nouvelles espèces lactiques ont été isolées de la viande, il s'agit de *Lactobacillus versmoldensis* (Krockel *et al.*, 2003) et *Vagococcus carniphilus* (Shewmaker *et al.*, 2004). Ces deux espèces ont été respectivement isolées du saucisson cru et de la viande hachée. Parallèlement, *Carnobacterium piscicola* a été reclassée comme *Cb. maltaromaticum* (Mora *et al.*, 2003). Koort *et al.*, (2004) a montré quant à lui que *Lb. curvatus subsp. melibiosus* est synonyme de *Lb. sakei subsp. carnosus*.

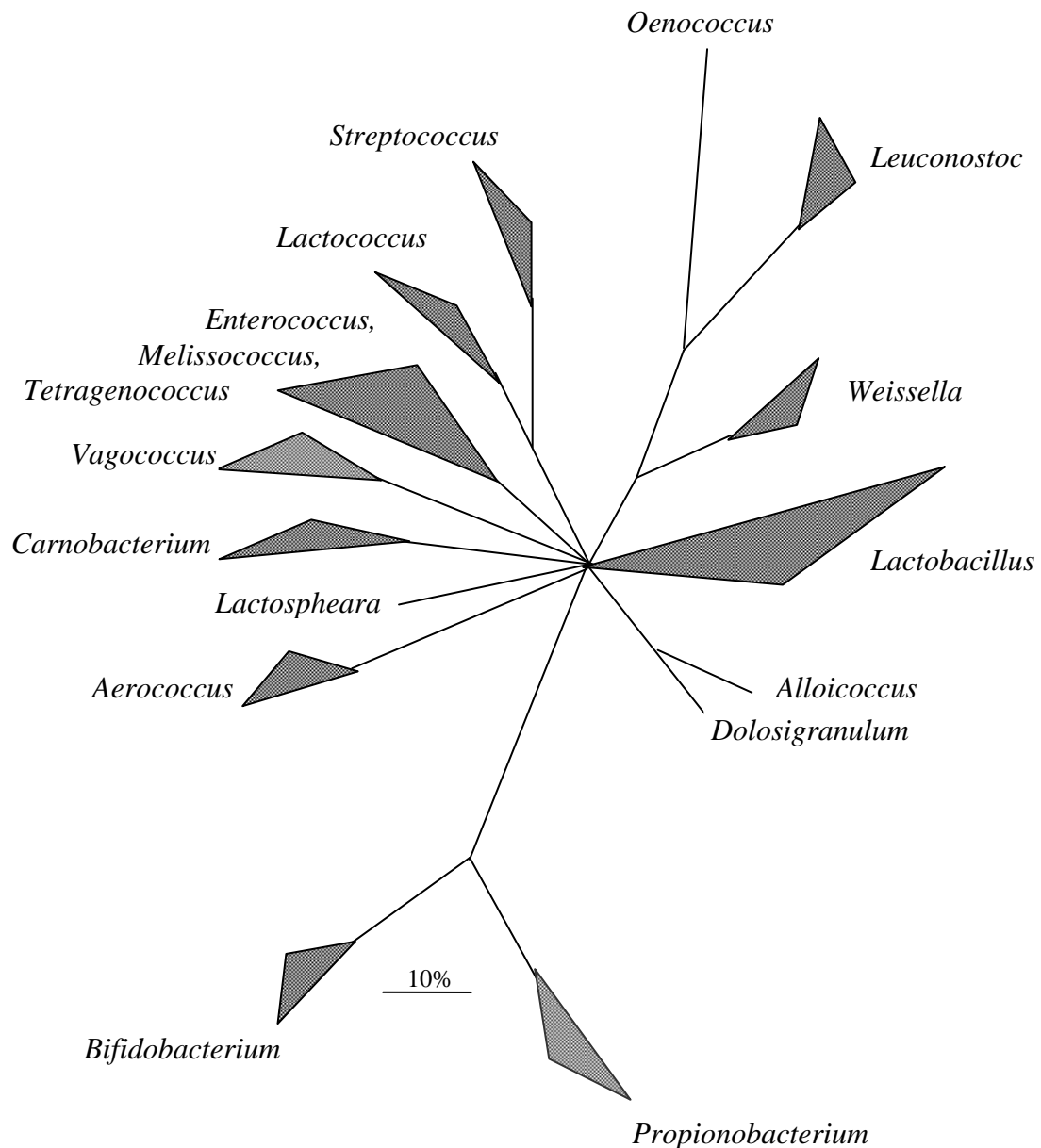


Figure 1 : Arbre consensus, basé sur l'analyse comparative des séquences ARNr, montrant les principaux groupes phylogénétiques de bactéries lactiques à faible % G+C et les genres Gram-positifs non reliés *Bifidobacterium* et *Propionibacterium* (Holzapfel *et al.*, 2001)

4. Classification des bactéries lactiques

4.1. Classification des genres

La première classification des bactéries lactiques a été établie en 1919 par Orla-Jensen sur divers critères morphologiques et physiologiques (activités catalase et nitrite réductase, type de fermentation) (Stiles et Holzapfel, 1997). Les méthodes phénotypiques permettant la classification des bactéries se sont ensuite étendues à la composition de la paroi, le type d'acides gras

cellulaires, le type de quinones (accepteur d'électrons). Cependant ces méthodes phénotypiques ne rendent pas compte des relations phylogénétiques entre les groupes. En 1977, Woese et Fox introduisent la phylogénie moléculaire basée sur la séquence des ARN ribosomiques. Cette méthode va révolutionner la taxonomie des bactéries, et la classification des BL va être profondément modifiée. D'autres méthodes génotypiques (basées sur les acides nucléiques) sont aussi utilisées en classification, comme le pourcentage en GC ou l'hybridation ADN/ADN (Penaud, 2006).

L'approche consistant à prendre en compte les méthodes phénotypiques et génotypiques s'appelle la taxonomie polyphasique (Vandamme *et al.*, 1996). La technique de MLST (pour Multi Locus Sequence Typing), basée sur la divergence nucléique de gènes de ménage, est utilisée pour la classification des BL pathogènes notamment les streptocoques. Cependant cette technique n'a pas été utilisée pour d'autres BL.

Les bactéries lactiques sont un groupe de bactéries unies par une constellation de caractéristiques, métaboliques, et physiologiques. Elles appartiennent à la lignée des Firmicutes, à la classe des Bacilli, et à l'ordre des Lactobacillales (Garrity et Holt, 2001). Phylogénétiquement, elles appartiennent au phylum des *Clostridium* des bactéries Gram-positif (G+C < 50 mol%). En outre, bien qu'il y ait des applications de certaines souches du genre *Sporolactobacillus*, en l'occurrence *S. cellulosolvens* ou *S. inulinus*, dans la fermentation conduisant à la production d'acide lactique (Kanwar *et al.*, 1995 ; Abelyan, 1997), les sporolactobacilles ne sont pas des bactéries lactiques.

La classification la plus récente des bactéries lactiques suggère la subdivision de groupe lactique en plusieurs genres : *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Aerococcus*, *Lactobacillus* et *Carnobacterium* (Axelsson, 1998; Leisner *et al.*, 2000).

La différenciation entre ces genres est basée sur des critères physiologiques, biochimiques et morphologiques regroupés dans le tableau 01.

4.1.1. Les genres *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Vagococcus*.

Les différentes espèces appartenant à ces genres étaient, il y a encore peu de temps, regroupées en un seul genre qui est *Streptococcus*. Ce genre regroupe de nombreuses bactéries en

forme de coques et ayant pour principales caractéristiques : Gram+, asporogènes, métabolisme homofermentaire produisant principalement de l'acide lactique et un contenu en CG% de 35% à 46%. La présence dans leur enveloppe d'antigène spécifique a été d'une grande utilité dans leur identification et leur classification par groupes sérologiques de Lancefield (1933) (Kandler & Weiss , 1986 ; Collins *et al.* , 1987).

Schleifer & Kilper-Balz (1987) ont proposé de subdiviser le genre *Streptococcus* en 4 genres. Il s'agit de *Streptococcus sensu stricto*, *Lactococcus*, *Vagococcus* et *Enterococcus*.

Le genre *Streptococcus sensu stricto* comprend la majorité des espèces et en particulier :

- Le groupe pyogènes : comprend 5 espèces α et/ou β hémolytique, pathogènes pour l'homme et/ou les animaux.
- Le groupe oralis comprend : *Sc. viridans* , *Sc. mitior* , *Sc. intermedius* , *Sc. pneumoniae* souvent α hémolytiques pathogènes opportunistes.
- Le groupe des autres streptocoques et en particulier *Sc. salivarius* subsp. *salivarius* qui est étroitement apparenté à *Sc. thermophilus*. C'est la raison pour laquelle Farrow & Collins, (1984) proposent de considérer *Sc. thermophilus* comme sous espèce de *Sc. salivarius*. Cette proposition était renforcée par les résultats d'étude de l'hybridation ADN / ADN (Axelsson , 1998).

Le groupe des Lactocoques correspond aux streptocoques mésophiles de la flore lactique. En dehors des cinq espèces actuellement reconnues seule l'espèce *Lactococcus lactis* est utilisée en industrie laitière. Cependant pour l'espèce *Lactococcus lactis* trois sous espèces ont été attribuées : *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. Seules les deux premières *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* et *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* sont importantes dans l'industrie laitière (Axelsson , 1998).

La capacité des lactocoques à croître à une température de 10°C et pas à 45°C est une caractéristique qui les distingue des autres *Enterococcus* des *Streptococcus*. La plupart des lactocoques réagissent avec les anti-sérums du groupe N (Desmazeaud, 1992).

Le genre *Enterococcus* de groupe sérologique D, présent dans le tube digestif de l'homme et des animaux et dont certaines espèces sont pathogènes opportunistes, le genre *Enterococcus* n'était pas inclus dans la classification de Bergey, cependant quelques espèces étaient incluses dans le genre *Streptococcus*.

Schleifer & Kilpper-Bälz (1987) ont proposé de transférer certaines espèces du genre *Streptococcus* dans le nouveau genre : *Enterococcus*. Il s'agit de *Streptococcus faecalis*, et *Streptococcus faecium*, qui sont devenues ainsi *Enterococcus faecalis* (espèce type) , et *Enterococcus faecium* (Leclerc *et al.*, 1996).

Enfin , les traits phénotypiques caractéristiques des *Enterococcus* (croissance entre 10°C et 45°C , en présence 6,5% de NaCl et à pH 9,2) ont été confirmés par des études sur l'hybridation ADN/ADN et sur le catalogue de ARN_r.16_s (Gasser *et al.* , 1994) .

Le troisième groupe des Streptocoques, regroupant des coques présentant une ciliature péritriche, a été désigné sous les noms de "streptocoques lactiques mobiles" ou de "streptocoques mobiles du groupe N" ou de "lactocoques mobiles" ou de "souches apparentées à *Lactococcus lactis*". L'étude de la séquence de l'ARNr 16S a permis à Collins *et al.*, (1990) de placer ces coques mobiles dans un nouveau genre, le genre *Vagococcus*, phylogénétiquement proche des genres *Enterococcus* et *Carnobacterium*. Initialement, le genre *Vagococcus* comprenait une seule espèce, *Vagococcus fluvialis*. Ultérieurement, cinq nouvelles espèces ont été incluses dans ce genre sur la base d'études phylogénétiques et/ou des hybridations ADN/ADN : *Vagococcus carniphilus*, *Vagococcus elongatus*, *Vagococcus fessus*, *Vagococcus lutrae* et *Vagococcus salmoninarum* (Aguirre et Collins, 1992).

Les souches mobiles de *Vagococcus ssp* se différencient des entérocoques mobiles (*Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus flavescens*, *Enterococcus gallinarum*) par leur incapacité à acidifier le L-arabinose et le raffinose. Les espèces de ce genre récemment décrites se confondent facilement avec les lactocoques et se distinguent principalement par leur composition en acides gras et leur mobilité (Collins *et al.*, 1990).

4.1.2. Les genres *Aerococcus*, *Pediococcus* et *Tetragenococcus*

Les pediocoques sont formés de cellules groupées en paires ou en tétrades. Il s'agit de bactéries microaérophiles, leur métabolisme homofermentaire produit principalement de l'acide DL lactique, bien que l'acide L (+) lactique prédomine (Garvie, 1986 ; Deroissard , 1994 ; Holt *et al.* , 1994) .

L'étude de la composition en bases de l'ADN, montre que les pediocoques ont un GC% compris entre 37,8% - 41,2% contre 42,0 – 43,2% pour les streptocoques. D'autre part la nature du peptidoglycane constitue un critère important qui distingue le genre *Pediococcus* du genre *Streptococcus*. Actuellement, les tests immunologiques de précipitation sont d'une grande importance, ils sont utilisés pour trancher entre les différentes espèces de deux genres. Les espèces se différencient par leur tolérance à la température, au pH et au NaCl et par leur spectre fermentaire. Les différentes espèces du genre *Pediococcus* sont présentes dans les végétaux en

décomposition, parfois dans les boissons : bière, cidre et vin. *P. pentasaceus* avec *P. acidilactici* sont bien représentées dans les matières végétales mais peuvent aussi être trouvées dans le lait et les produits laitiers (Simpson et Taguchi 1995).

Le genre *Aerococcus* a été proposé en 1953 pour classer des coques à Gram positif, catalase négative, aéro-anaérobies, se différenciant des streptocoques par son mode de groupement. Les souches d'*Aerococcus ssp* se présentent sous la forme de coques à Gram positif, immobiles, groupés en tétrades ou en amas. *Aerococcus viridans* est souvent considérée comme un simple contaminant de l'air et cette bactérie est également présente dans divers prélèvements : eau douce et eau de mer, sol, sédiments marins, végétaux, produits d'origine animale (Vela *et al.*, 2007).

Le genre *Tetragenococcus* regroupe des souches étroitement apparentées à l'espèce *Pediococcus halophilus*. Une seule espèce a été récemment reconnue, il s'agit de *Tetragenococcus halophilus* (Collins *et al.*, 1990).

Il a été démontré, qu'en plus de leur tolérance extrême au sel (>18% de NaCl), qui les distingue des autres bactéries lactiques ; *Tetragenococcus* a besoin de sel pour sa croissance, généralement 5% de NaCl, c'est la raison pour laquelle cette espèce s'est avérée très importante dans la fabrication des produits fermentés et surtout ceux contenant une concentration élevée en sel (Garvie, 1986).

4.1.3. Le genre *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*

Les cellules de *Leuconostoc* sont des coques en paires ou en chaînes comme les streptocoques mais les *Leuconostoc* sont des bactéries hétérofermentaires produisant de l'acide D (-) lactique, de l'éthanol et du CO₂. Des études phylogénétiques, basées sur les séquences des ARNr 16S et 23S, ont montré que les espèces du genre *Leuconostoc* sont hétérogènes et peuvent être divisées en trois groupes : un groupe comprenant *Leuconostoc paramesenteroides*, un groupe formé par *Leuconostoc oeni* (actuellement reclassé dans le genre *Oenococcus*) et un groupe rassemblant *Leuconostoc mesenteroides* (espèce type du genre) ainsi que les autres espèces du genre *Leuconostoc*. Ces études révélaient également que cinq espèces hétérofermentaires du genre *Lactobacillus* (*Lactobacillus confusus*, *Lactobacillus halotolerans*, *Lactobacillus kandleri*, *Lactobacillus minor* et *Lactobacillus viridescens*) étaient apparentées à *Leuconostoc paramesenteroides* (Martinez- Muracia et Collins, 1990).

En 1993, Collins *et al.*, réalisent une étude taxonomique sur des souches bactériennes ressemblant à des *Leuconostoc ssp.* et isolées de saucissons secs fabriqués en Grèce. L'étude des séquences des ARNr 16S a permis de classer ces souches dans le groupe constitué par *Leuconostoc paramesenteroides* et les cinq espèces de lactobacilles hétérofermentaires. En se basant sur les résultats de leur étude et sur les résultats des études antérieures, Collins *et al.* (1990) transfèrent l'ensemble de ces espèces dans le nouveau genre *Weissella* et ils proposent la création de six nouvelles combinaisons (*Weissella confusa*, *Weissella halotolerans*, *Weissella kandleri*, *Weissella minor*, *Weissella viridescens* et *Weissella paramesenteroides*) pour reclasser *Lactobacillus confusus*, *Lactobacillus halotolerans*, *Lactobacillus kandleri*, *Lactobacillus minor*, *Lactobacillus viridescens* et *Leuconostoc paramesenteroides* ainsi que la création d'une nouvelle espèce (*Weissella hellenica*) pour les souches isolées de saucissons grecs (Walter *et al.*, 2001).

Les espèces du genre *Weissella* sont constituées de courts bacilles ou de coccobacilles ou des coques ovoïdes, à Gram positif, se présentant de manière isolée ou groupés par deux ou en courtes chaînes, non sporulés, immobiles, possédant un peptidoglycane du type A3alpha, catalase négative (Walter *et al.*, 2001).

4.1.4. Le genre *Lactobacillus* et *Carnobacterium*

Les lactobacilles et les *Carnobacterium*s, sont des bactéries Gram⁺, polymorphes asporogènes, non pigmentées, immobiles (sauf *Lb. agilis*), catalase⁻, nitrate⁻, gélatine-, leur morphologie va de cocci plus ou moins allongés à des formes longues, ce qui les rend parfois difficile à les distinguer des *Leuconostoc*. Leur GC% varie de 32 à 53% (Axelsson, 1998).

Quant à leur classification, la division du genre *Lactobacillus* en trois sous genres, *Thermobacterium*, *Streptobacterium* et *Betabacterium*, a été proposée pour la première fois par Orla Jensen (1919). Cette classification tenait compte essentiellement de la répartition des voies de fermentation chez ces bactéries.

Actuellement, cette classification des sous genres a disparue de la dernière édition du *Bergey's manuel* (Kandler & Weiss, 1986). Cette même classification a été reprise, mais sous une forme numérotée. Ainsi, on distingue dans le tableau 02 trois groupes de bactéries lactiques classées en fonction de leurs caractéristiques fermentaires (Schleifer, & Ludwig 1995 ; Axelsson, 1998).

- a) 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 ou L). Ils ne métabolisent pas les pentoses et ne dégagent pas de CO₂ lors de la fermentation du glucose ou du gluconate. La production de l'acide lactique est supérieure à 85% à partir du glucose
- b) Les Lactobacillus 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.
- c) 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 glycéraldéhyde-3-phosphate/pyruvate kinase/lactate déshydrogénase. Ces bactéries produisent du CO₂ lors de la fermentation du glucose et du gluconate. La production de l'acide lactique est d'environ 50% avec des quantités importantes en acide acétique, éthanol et CO₂ ;

Tableau 02 : Classification des groupes du genre *lactobacillus* (Axellsson, 1998).

Caractères	Groupe I Homofermentaires	Groupe II Hétérofermentaires facultatifs	Groupe III Hétérofermentaires obligatoires
Fermentation des pentoses	-	+	+
Glucose (production de CO ₂)	-	-	+
Gluconate (production de CO ₂)	-	+	+
FDP aldolase	+	+	-
Phosphocétolase	-	+	+
Espèces	<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. delbruekii</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>

Le genre *Carnobacterium* est constitué de bacilles minces, droits ou légèrement incurvés, à Gram positif, se présentant de manière isolée ou groupée par deux ou parfois en courtes chaînes. Il

est non sporulé, mobile ou immobile, aéro-anaérobie facultatif, catalase négative, oxydase négative, nitrate réductase négative, à métabolisme fermentatif (production d'acide lactique). Les *Carnobacterium* sont incapables de croître sur des milieux à base d'acétate, ne peuvent pas croître ni en présence de 8 % NaCl ni à 45°C et peuvent croître à 10°C et parfois à 0°C. Il est difficile de distinguer le genre *Carnobacterium* du genre *Lactobacillus*. On peut noter que les *Carnobacterium ssp.* ne se développent pas sur les milieux à l'acétate de Rogosa et sont capables de se développer à des pH plus élevés que ceux des *Lactobacillus ssp.* (Croissance possible jusqu'à pH 9,1). Ils sont parfois mobiles (*Cb. alterfunditum*, *Cb. funditum*, *Cb. inhibens* et *Cb. mobile*), et produisent principalement de l'acide L-lactique. Leur principal acide gras est l'acide oléique et leur peptidoglycane est du type A1 gamma. (Collins *et al.*, 1987).

En 1991, le genre *Carnobacterium* s'est enrichi de deux espèces (*Cb. funditum* et *Cb. alterfunditum*) (Franzmann *et al.*, 1991). Jøborn *et al.*, (1999) ont proposé l'espèce *Cb. inhibens* pour identifier une souche isolée du tube digestif d'un saumon de l'Atlantique (*Salmo salar*), en se basant sur l'analyse de la séquence des ARNr 16S et des caractères phénotypiques. La nomenclature de *Cb. viridans* a été publiée pour trois souches isolées d'une sauce bolonaise emballée sous vide (Holley *et al.*, 2002).

CHAPITRE II

MÉTHODES D'IDENTIFICATION ET DE CLASSIFICATION DES BACTÉRIES LACTIQUES

1. Méthodes d'identification des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques ont de nombreuses propriétés métaboliques dont les industriels et les nutritionnistes cherchent à tirer le meilleur parti. Ces propriétés (technologiques, sensorielles, antimicrobiennes ou probiotiques) sont spécifiques de l'espèce ou de la souche bactérienne, ce qui implique qu'on puisse les mettre en évidence par des techniques d'identification et de différenciation, cela est d'autant plus important que certaines bactéries lactiques ont un caractère pathogène (par exemple : streptocoques type D).

1.1. Analyse phénotypique

Les tests traditionnels phénotypiques constituent la base de description et de différenciation des bactéries lactiques. Différents tests clefs sont largement adoptés. La morphologie ainsi que les méthodes physiologiques, métaboliques/biochimiques et chimiotaxonomiques sont les plus utilisées. Les méthodes physiologiques incluent, principalement, la croissance à certaines températures, à certaines concentrations de sel et sur gélose citratée. Les méthodes métaboliques ou biochimiques incluent, principalement, la production de gaz à partir de glucose (Sperber et Swan, 1976), le profil d'hydrolyse des sucres, l'hydrolyse de l'arginine (Montel et Champomier, 1987) et la détermination de la configuration de l'acide lactique (Gutmann et Wahlfeld, 1974). Les méthodes chimiotaxonomiques incluent, principalement, la détection de l'acide *meso*-diaminopimélique (*mDAP*) dans le peptidoglycane (Bousfield *et al.*, 1985 ; Marconi *et al.*, 2000).

Schillinger et Lucke (1987) ont été les premiers à proposer une clef d'identification des bactéries lactiques basée sur la comparaison des caractéristiques physiologiques et biochimiques typiques des différentes espèces. Néanmoins cette clef permettait uniquement d'orienter l'identification et non une identification précise. Elle différenciait aussi entre *Lactobacillus carnis* et *Lactobacillus piscicola* alors que ces microorganismes ont été génétiquement désignés comme *Cb. maltaromaticum* (ex. *Cb. Piscicola*) (Collins *et al.*, 1987). Montel *et al.*, (1991) ont proposé par la suite une simple clef pour l'identification des *Lactobacillus* et *Carnobacterium*

homofermentaires (figure 02). Cette clef, basée sur des tests biochimiques, physiologiques et chimiotaxonomiques mentionnés précédemment, a été vérifiée par hybridation ADN/ADN et reste encore valable, si ce n'est le fait que *Lactobacillus viridescens* et *Lactobacillus halotolerans* ont été reclassés dans un autre genre, en l'occurrence *Weissella* (Collins *et al.*, 1993). Aussi, *Cb. piscicola* a été reclassé comme *Cb. moltaromaticum* (Mora *et al.*, 2003).

1.2. Méthodes chimio-taxonomiques

1.2.1. Analyse des protéines cellulaires solubles par électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE)

Le principe de cette méthode repose sur le fait que deux souches bactériennes possèdent un niveau d'hybridation ADN-ADN de 90 à 100% et cultivées dans les mêmes conditions, produisent un même ensemble de protéines visualisé sous la forme d'une empreinte. Ainsi leurs électrophorégrammes (ou profils protéiques) résultant de la séparation du mélange de protéines cellulaires par électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) ne présenteront que des différences minimales. Les souches partageant une homologie d'ADN d'au moins 70%, présentent des empreintes protéiques ayant aussi un niveau élevé de similitude et produisent des électrophorégrammes encore assez semblables (Kersters, 1985). Des banques de profils ont été créées grâce au développement d'un protocole très standardisé (Pot *et al.*, 1994) et d'outils informatiques adaptés facilitant les comparaisons et les regroupements à l'aide de coefficients de similitude (Vauterin et Vauterin, 1992). L'électrophorèse des protéines est donc une méthode très sensible qui permet de différencier les bactéries lactiques à un niveau taxonomique fin, en l'occurrence la sous-espèce ou la souche (Gatti *et al.*, 2001). Cette méthode a été appliquée pour la différenciation entre *Lb. sakei* et *Lb. curvatus* isolées de produits carnés fermentés (Dykes *et al.*, 1995).

1.2.2. Analyse des acides gras de paroi par chromatographie en phase gazeuse

L'analyse des acides gras (A.G) des parois bactériennes par l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse est une méthode rapide, sensible et sélective, permettant l'identification des bactéries lactiques moyennant une comparaison des chromatogrammes obtenus à des banques de données de profils d'A.G (Dykes *et al.*, 1995). Néanmoins les conditions de culture (apport nutritionnel, température de croissance, âge de la culture) doivent être bien établies et normalisées (Gilarova *et al.*, 1994).

Les bactéries lactiques contiennent différents types d'A.G. Les lactobacilles et les pédiocoques sont principalement caractérisés par une prépondérance d'A.G à longues chaînes linéaires saturées ou mono-insaturées, très souvent à nombre pair d'atomes de carbone et d'A.G cyclopropanoïques. Les A.G à chaînes ramifiées iso ou antesio et les A.G hydroxyliques ou polyinsaturés sont absents de ce type de bactéries (ou à l'état de traces) (Rizzo *et al.*, 19987 ; Rementzis et Samelis, 1996). Cette méthode a été utilisée pour la différenciation entre *Lb. sakei* et *Lb. curvatus* isolées de produits carnés fermentés (Rementzis et Samelis, 1996).

1.3. Méthodes étudiant la structure des acides nucléiques

1.3.1. Contenu en guanine et cytosine de l'ADN chromosomique

L'intérêt de la mesure du contenu en G+C (mol%) est lié à la grande diversité de la composition en guanine et en cytosine de l'ADN des microorganismes, puisqu'elle va de 25% pour *Mycoplasma capricolum* à 75% pour *Micococcus luteus* (Muto et Osawa, 1987). On peut conclure que deux isolats bactériens sont d'espèces différentes que si la différence de leur contenu G+C est d'au moins 5% ; toutefois, deux souches ayant le même G+C ne sont pas forcément semblables parce que cette valeur ne prend pas en compte l'arrangement linéaire des nucléotides dans l'ADN.

Le contenu GC des bactéries lactiques est généralement inférieur à 50 mol% étant donné qu'elles appartiennent au phylum *Clostridium*. Le genre *Lactobacillus* montre une grande diversité génétique. En effet, le contenu GC varie entre un minimum de 32% pour *Lactobacillus mali* et un maximum de 54% pour *Lactobacillus fermentum* ou *Lactobacillus pontis*. Cette amplitude est deux fois plus grande que le seuil de 10% proposé pour l'identité du genre (schleifer et Stackebrandt, 1983). En outre, ces contenus GC maximum excèdent les 50 mol% proposés comme seuil de séparation entre les phylums des *Clostridium* et des Actinomyces. (Champonier-Vergés *et al.*, 2002).

1.3.2. Hybridation ADN-ADN

L'hybridation ADN-ADN repose sur la dénaturation de molécules d'ADN totaux appartenant à deux souches, puis à leur réappariement. La formation d'hétéroduplex (brin de chaque souche) sera gouvernée par le degré de ressemblance des deux génomes. Le pourcentage de réassociations hétérologues est ensuite calculé. La stabilité thermique est également un paramètre important car elle permet de mesurer le degré de mauvais réappariement au sein de

l'hétéroduplex. Il est généralement admis qu'au dessus de 70% d'homologie, deux souches font partie de la même espèce. Néanmoins, le niveau exact permettant d'affirmer que deux bactéries sont d'espèces différentes varie selon le genre bactérien (Zakrzewska-Czerwinska *et al.*, 1988).

Cette méthode a été utilisée pour l'identification des bactéries lactiques fréquemment isolées de la viande. En l'occurrence *Lb. sakei*, *Lb. plantarum*, *Lb. farciminis*, *Lb. alimentarius*, *Weissella halotolerans*, *W. viridescens*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Cb. divergens* et *Cb. piscicola* (Montel *et al.*, 1991)

1.3.3. Séquençage de l'ARNr 16S

Les séquences ribosomiques reflètent le génotype des bactéries. La stratégie de séquencer l'ARNr contenant des morceaux de régions variables et d'effectuer une analyse comparative de la séquence avec celles contenues dans des bases de données déjà existantes permet de déterminer les régions présentant une variabilité. Ces régions variables sont utilisées pour la synthèse de sondes oligonucléotidiques ou amorces PCR.

C'est principalement l'ARNr 16S pour lequel un grand nombre de séquences sont données. Bien que la région de l'ARNr 16S spécifique à l'espèce est localisée dans les régions V1 à V3, l'identification est plus précise, si tout le gène est séquencé (Stackebrandt et Goebel, 1994). Dans certains cas, l'analyse de séquence de la région entre les gènes 16S et 23S (Intergenic Spacer Region = ITS) a une expression beaucoup plus forte concernant la spécificité de l'espèce, que l'ARNr 16S lui même et souvent des espèces comme *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus* et *Lb. pseudopplantarum* ou *Lb. casei* et *Lb. rhamnosus* peuvent être discriminées (Berthier et Ehrlich, 1998). D'autres gènes spécifiques au genre (Ke *et al.*, 1999) ou à l'espèce (Dutka-Malen *et al.*, 1995) ont été séquencés.

Ainsi, des amorces espèce-spécifiques ont été développées pour la plupart des bactéries lactiques fréquemment isolées de la viande et des produits carnés : *Lb. sakei*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum* (Berthier et Ehrlich, 1998), *Lb. farciminis*, *Lb. alimentarius* (Rachman *et al.*, 2003), *Cb. Divergens*, *Cb. Pisicola* (Rachman *et al.*, 2004), *Ec. Faecium* (Dutka-Malen *et al.*, 1995), *Ln. Mesentroides* subsp. *mesentroides* (Moschetti *et al.*, 2000).

CHAPITRE III

POTENTIELS INDUSTRIELS ET TECHNOLOGIQUES DES BACTERIES LACTIQUES

1. Utilisations industrielles des bactéries lactiques

Les caractéristiques métaboliques des bactéries lactiques en font des acteurs indispensables au cours des fermentations alimentaires. Les bactéries lactiques sont classiquement impliquées dans un grand nombre de fermentations alimentaires, seules ou avec d'autres micro-organismes (transformation du lait, boissons fermentées, salaison, fermentation des végétaux), et sont également étroitement associées à l'environnement humain (Tableau 03). Le principal atout de ces bactéries réside donc dans leur capacité à acidifier les produits alimentaires. Le L- acide lactique, qui est le produit principal du métabolisme fermentaire, joue un rôle majeur dans la conservation des aliments puisqu'il inhibe fortement la croissance des bactéries pathogènes à bas pH (Stiles, 1996). Il a également un rôle direct dans l'industrie laitière puisqu'il permet la formation du caillé à bas pH. Les bactéries lactiques participent également à la texture (production d'exopolysaccharides) et à la saveur des produits laitiers. Les arômes sont multiples, parfois indésirables (amines biogènes) et peuvent provenir d'origines diverses, soit du catabolisme des hydrates de carbone présents dans le lait (lactose, citrate.), soit du métabolisme des acides aminés ou encore des matières grasses (Moroni, 2007).

De nos jours, les bactéries lactiques font l'objet de recherches intensives qui sont améliorées par la disponibilité de la séquence complète du génome de nombreuses bactéries lactiques : *Lactococcus lactis* IL1403 (Bolotin *et al.*, 2001), *Lactobacillus plantarum* WCFS1 (Kleerebezem *et al.*, 2003), *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 (Pridmore *et al.*, 2004), *Lactobacillus acidophilus* NCFM (Altermann *et al.*, 2005). La production sans cesse en augmentation de produits laitiers fermentés et surtout de fromage, 18 millions de tonnes en 2004 alors que seulement 15 millions de tonnes étaient produites en 1999 (source statistique FAO cité par Dortu, 2008), conduit aujourd'hui à une rationalisation indispensable de l'utilisation des ferments lactiques dans l'industrie. Les technologies laitières constituent le secteur principal d'application des bactéries lactiques. La compréhension de la physiologie de ces micro-organismes contribue ainsi à

un meilleur contrôle des procédés de même qu'à l'amélioration et à la diversification des qualités organoleptiques et texturales des produits laitiers fermentés.

Pour cela diverses stratégies ont été mises en place, il s'agit tout d'abord d'une meilleure sélection des souches et leur utilisation en mélanges complexes dans des levains de culture. Une optimisation métabolique des souches a également été envisagée afin d'augmenter la production d'arômes (Hugenholtz *et al.*, 2000), de polysaccharides, de vitamines ou encore de la protéolyse des protéines du lait.

Les bactéries lactiques sont également impliquées dans de nouveaux types de produits en tant que «probiotiques». Il s'agit de micro-organismes vivants qui une fois ingérés, vont conférer un effet physiologique bénéfique à leur hôte animal grâce à leurs propriétés microbiennes (Fuller, 1992). Les genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Enterococcus* abritent des espèces considérées comme probiotiques (Gordin et Gorbach, 1992). D'autres bactéries, qui ne colonisent pas naturellement le tractus digestif des mammifères, mais sont utilisées comme starters dans l'industrie laitière sont également considérées comme des probiotiques, *Lb. bulgaricus* et *St. thermophilus*. Leur classification dans les probiotiques ainsi que parmi les microorganismes GRAS fait de ces bactéries des acteurs potentiellement importants dans les domaines de la médecine et de la santé : amélioration de la digestion du lactose, stimulation du système immunitaire, vecteurs de molécules à effets thérapeutiques.

Tableau 03 : Utilisations des bactéries lactiques dans la fermentation alimentaire et exemples des espèces prédominantes (d'après McKay et Baldwin, 1990).

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

2. Rôles probiotiques des bactéries lactiques

2.1. Critères de sélection des souches probiotiques

La notion de "probiotiques" a été développée grâce aux travaux de Metchnikoff (1907) qui avait constaté que les paysans bulgares, grands consommateurs de laits fermentés, vivaient très vieux et en bonne santé. Ainsi, Metchnikoff avait proposé l'ingestion de bactéries vivantes, particulièrement des bactéries lactiques, pour réduire les désordres intestinaux et améliorer l'hygiène digestive, et donc augmenter l'espérance de vie (Gournier-Château *et al.*, 1994).

Le terme probiotique dérive des deux mots grecs "pros" et "bios" qui signifient littéralement "pour la vie" contrairement au terme antibiotique signifiant "contre la vie". Ce terme a été introduit pour la première fois par Lilly et Stillwell (1965) pour décrire des substances produites par un microorganisme et stimulant la croissance d'autres microorganismes. Depuis, plusieurs définitions ont été données aux probiotiques dépendamment de leurs effets sur la santé. Selon Parker (1974), «

probiotiques » désigne les microorganismes et les substances qui contribuent au maintien de l'équilibre de la flore intestinale. Cette définition englobant les microorganismes et les métabolites microbiens produits (les antibiotiques), a été modifiée par Fuller (1989) qui redéfinit les probiotiques comme étant : "des préparations microbiennes vivantes utilisées comme additif alimentaire et qui ont une action bénéfique sur l'animal hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale". Enfin, selon la définition adoptée par le groupe de travail mixte formé par l'Organisation des Nations Unies (ONU) pour l'agriculture et l'alimentation et l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) (Rapport du FAO/WHO, 2002), les probiotiques sont « des microorganismes vivants administrés en quantités adéquates et qui sont bénéfiques pour la santé de l'hôte » (Amrouche, 2005).

De façon plus spécifique, pour qu'un organisme soit considéré comme étant potentiellement probiotique, il doit présenter les caractéristiques suivantes :

- ✚ Être un habitant naturel de l'intestin,
- ✚ Être capable de coloniser le milieu intestinal, persister et se multiplier
- ✚ Adhérer aux cellules intestinales et exclure ou réduire l'adhérence des pathogènes
- ✚ Avoir un métabolisme actif et produire des substances inhibant les pathogènes (acides, H₂O₂, bactériocines...)
- ✚ Être non invasif, non carcinogène et non pathogène
- ✚ Être capable de co-agréger pour former une flore normale équilibrée
- ✚ Survivre aux différents procédés technologiques de production
- ✚ Garder sa viabilité dans l'aliment et durant le transit intestinal (Stanton *et al.*, 2001).

Dans toutes les définitions prononcées, la notion de viabilité apparaît comme un critère de sélection important. Cependant, cette notion demeure très controversée puisque des études récentes, ont clairement démontré que même les souches non viables de probiotiques sont capables d'exercer certains effets positifs sur la santé entre autre la stimulation de certaines fonctions immunitaires, l'inhibition de l'adhésion et l'invasion de certains pathogènes (Ouwehand *et al.*, 1999). Ceci laisserait donc envisager une éventuelle redéfinition des probiotiques où la notion de viabilité sera à reconsidérer.

2. 2. Les probiotiques et leurs effets bénéfiques sur la santé

Différents effets positifs sont ainsi attribués aux probiotiques. Cependant, des études doivent encore être réalisées afin de confirmer certains bienfaits. Ces effets sont décrits dans le tableau 04 et expliqués ci-dessous.

Il est à noter que la validité scientifique de ces effets bénéfiques est très variable. Pour certains effets, des preuves scientifiques irréfutables appuyées par des études cliniques existent et permettent d'attribuer certaines allégations-santé aux produits probiotiques (Moroni, 2007).

Tableau 04 : Effets positifs des probiotiques sur la santé (effets probables ou suspectés) (Moroni, 2007)

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

a) Les probiotiques et les infections gastro-intestinales : des études cliniques ont démontré que des infections gastro-intestinales causées par *Helicobacter pylori*, la diarrhée du voyageur, diarrhée due aux rotavirus, diarrhée associée aux antibiotiques comme celle causée par *Clostridium difficile*, peuvent être contrecarrées avec succès par l'utilisation de probiotiques (Mercenier *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004 ; Plummer *et al.*, 2004). A titre d'exemple Wang *et al.*, (2004) ont rapporté que la consommation régulière de yogourt additionné de *Lactobacillus acidophilus* La5 ou de *Bifidobacterium lactis* Bb12 induit une suppression effective de l'infection due à *H. pylori*. Tandis que Rosenfeldt *et al.*, (2002) ont mentionné que des souches de *Lb. rhamnosus* et *Lb. reuteri* ont permis de traiter des gastro-entérites à rotavirus chez des enfants hospitalisés.

b) Les probiotiques et l'intolérance au lactose : il a été rapporté que la consommation de lait ou de yogourt enrichis en probiotiques améliore l'absorption de lactose chez les patients déficients en lactase et réduit les symptômes digestifs dus à l'intolérance au lactose. Jiang *et al.*, (1996) ont démontré que la consommation de lait contenant des souches de *Bifidobacterium longum* réduit les symptômes du mal absorption de lactose chez des sujets humains suite à une élévation de la sécrétion de β - galactosidase.

c) Les probiotiques et le cholestérol : des études préliminaires ont révélé que la consommation de yogourt ou de lait fermenté contenant des probiotiques entraînent une diminution du taux de cholestérol dans le sang, et par conséquent la réduction des risques d'hypercholestérolémie responsable des maladies coronariennes. Par exemple, Bukowska *et al.*, (1998) ont mis en évidence une diminution du taux de cholestérol sanguin chez des sujets soumis à un régime supplémenté avec *Lactobacillus plantarum*.

d) Les probiotiques et la prévention du cancer du colon : selon certaines études, les bactéries probiotiques ont la propriété d'inhiber les processus conduisant à la formation du cancer du colon chez l'homme (Matsumoto et Benno (2004).

e) Les probiotiques et les maladies inflammatoires de l'intestin : selon la littérature, les processus inflammatoires impliqués dans les pathologies de l'intestin de l'homme comme la maladie de Crohn, la colite ulcéreuse et la pouchite sont contrôlés par les probiotiques. Une étude de Guandalini (2002) a montré que l'ingestion de *Lactobacillus GG* entraîne une amélioration notable

de l'état clinique chez des enfants souffrant de la maladie de Crohn. De même Gosselink *et al.*, (2004) ont observé des effets cliniques bénéfiques chez des patients affectés par une colite ulcéreuse après ingestion de produits fermentés contenant *Lactobacillus GG* ($1-2 \cdot 10^{10}$ bactéries/jour).

f) Les probiotiques et la perméabilité intestinale : l'altération de la perméabilité intestinale (fonction-barrière) causée par une infection, toxines ou autre facteur favorise un transfert aberrant d'antigènes (y compris la microflore locale) à travers l'intestin en engendrant des réponses immunitaires inappropriées (réactions inflammatoires ou auto-immunes) (Gill *et al.*, 2001). Des études récentes ont montré que la consommation de probiotiques stabilise la fonction barrière de l'épithélium intestinal. Par exemple, Isolauri *et al.*, (2002) ont démontré que *Lactobacillus GG* normalise le processus de perméabilité intestinale chez le rat. En outre, une étude récente de Rosenfeldt *et al.*, (2004) a démontré qu'une administration de probiotiques (*Lactobacillus rhamnosus* et *Lactobacillus reuteri*) permet de stabiliser la fonction-barrière de l'intestin et de diminuer les symptômes gastro-intestinaux chez des enfants souffrant d'une dermatite atopique. Cependant les mécanismes impliqués dans cette normalisation ne sont pas encore bien connus.

g) Les probiotiques et la motilité de l'intestin : la motilité intestinale joue un rôle important dans la réduction de la croissance des microorganismes pathogènes dans l'intestin. Les probiotiques pourraient avoir des effets positifs sur la motilité de l'intestin en réduisant le temps de transit des microorganismes pathogènes (Amrouche, 2005). Verdu *et al.*, (2004) ont rapporté que l'effet de *Lactobacillus paracasei* sur la motilité de l'intestin se traduit par une atténuation de l'hypercontractilité post-infection du muscle. Ils suggèrent que les probiotiques peuvent être utilisés dans le traitement du syndrome de l'intestin irritable.

3. Propriétés inhibitrices des bactéries lactiques et la biopréservation des aliments

La conservation des aliments peut être assurée artificiellement par l'ajout d'inhibiteurs tels que le sel, la fumée, les composés chimiques (nitrate, nitrite...) mais aussi par la présence de bactéries lactiques. Elles ont en effet des propriétés inhibitrices intéressantes liées à différents mécanismes comme la compétition nutritionnelle et la production de métabolites qu'elles produisent naturellement lors de la fermentation (Dotru, 2008). Parmi les métabolites produits par les bactéries

lactiques, figurent les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle, l'acide acétique, les acides gras insaturés et les bactériocines.

- Les acides organiques sont produits par les bactéries lactiques lors du processus de fermentation et permettent d'inhiber la croissance des levures et d'autres bactéries qui ne peuvent se développer à pH acide. L'effet inhibiteur de ces acides organiques est principalement provoqué par les molécules non dissociées qui diffusent à travers les couches lipidiques des membranes des microorganismes provoquant ainsi un abaissement du pH dans le cytoplasme qui a pour conséquence la déstabilisation des cellules. Ouattara *et al.* (Ouattara *et al.*, 1997) ont testé l'inhibition de *Brochothrix thermosphacta*, *Carnobacterium piscicola*, *Lactobacillus curvatus* et *Lb. sakei*, *Pseudomonas fluorescens* et *Serratia liquefaciens* par les acides, acétique, lactique, citrique, propionique, benzoïque et sorbique en milieu de culture. Les quatre premiers acides, les plus solubles, ont montré une inhibition efficace de la croissance à des concentrations comprises entre 0,1 et 1% (p/v). Dans cette étude, *Brochothrix thermosphacta* et *Carnobacterium piscicola* étaient les bactéries les plus sensibles aux acides.

- Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), produit en présence d'oxygène, a tendance à s'accumuler en raison de l'absence de catalase chez les bactéries lactiques. Les enzymes impliquées dans cette production peuvent être la NADH oxydase, l' α -glycérophosphatase, la pyruvate oxydase, et la superoxyde dismutase. Le peroxyde d'hydrogène a un potentiel oxydatif capable d'inhiber certains microorganismes en altérant les acides nucléiques et en oxydant les lipides.

- Le dioxyde de carbone (CO_2) produit par les bactéries lactiques lors de la fermentation hétérolactique, crée une atmosphère anaérobie qui est toxique pour les bactéries aérobies strictes qui ont besoin d'oxygène comme seul accepteur final d'électrons lors de la respiration.

- Le diacétyle est issu du métabolisme du citrate et est produit principalement par les bactéries lactiques des genres *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus* et *Lactobacillus*. Ce composé possède à la fois des propriétés antimicrobiennes et des propriétés aromatiques qui sont intéressantes dans le domaine des produits laitiers. L'acidification qui a lieu lors de la production de yaourt par exemple, augmente l'action du diacétyle qui tend alors à inhiber préférentiellement les bactéries à Gram négatif ainsi que les levures, mais son effet reste limité, car le diacétyle présent dans les produits

fermentés n'est généralement pas en quantité suffisante pour contribuer efficacement à une activité antimicrobienne (Tahari, 2007).

- L'acide lactique est le métabolite majeur produit par les bactéries lactiques. Au cours de la fermentation, ses formes dissociée et non dissociée sont en équilibre et l'amplitude de la dissociation dépend du pH. A bas pH, une grande quantité de l'acide lactique est contenue dans sa forme non dissociée et est toxique pour beaucoup de bactéries, levures et moisissures. Lindgren et Dobrogosz (1990) ont montré qu'à différentes valeurs de pH, la concentration minimale inhibitrice (MIC) de la forme non dissociée était différente à l'encontre de *Clostridium tyrobutyricum*, *Enterobacter sp.* et *Propionibacterium freudebreichii* subsp. *shermanii*. En outre, les stéréo-isomères d'acide lactique diffèrent aussi dans l'activité antimicrobienne. L'acide L (+)-lactique est plus inhibiteur que l'isomère D (-) (Benthin et Villadsen, 1995).

- L'acide acétique, produit à faible échelle lors de la fermentation du saucisson, peut interagir avec les membranes cellulaires et causer une acidification intracellulaire et une dénaturation protéique. Son activité antimicrobienne est plus efficace que celle de l'acide lactique étant donné sa plus grande valeur de pKa (acide lactique 3.08 et acide acétique 4.75) et son grand pourcentage en forme non dissociée par rapport à l'acide lactique à un pH donné (Earnshaw, 1992). L'acide acétique est plus inhibiteur de *L. monocytogenes* que l'acide lactique. L'acide acétique agit de manière synergique avec l'acide lactique. En effet, l'acide lactique abaisse le pH du milieu favorisant ainsi l'augmentation de la toxicité de l'acide acétique.

- D'autres métabolites peuvent avoir un effet inhibiteur, tels que la reutérine et la reutéricycline produites par *Lactobacillus reuteri* (Ross *et al.*, 2002), cette dernière étant un antibiotique. La reutérine est produite lors de la phase stationnaire en anaérobiose en présence d'un mélange de glucose et de glycérol (ou de glycéraldéhyde) et permet d'inhiber les champignons, certains protozoaires et aussi une large proportion de bactéries à Gram négatif et positif. La reutéricycline, seul antibiotique produit par une bactérie lactique, est un type d'acide tétramérique. Son spectre d'inhibition est large et comprend notamment de nombreuses bactéries à Gram positif pathogènes (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*...) mais aussi *Escherichia coli* et *Salmonella ssp.* dans certaines conditions. De ce fait, son mode d'action ressemblerait à celui de la nisine (Ross *et al.*, 2002).

- Les acides gras insaturés sont actifs contre les bactéries à Gram-positif et peuvent présenter une activité antifongique dépendante de longueur des ramifications, la concentration et le pH du milieu (Gould, 1991). L'action antimicrobienne des acides gras serait due à la molécule non dissociée et pas l'anion, étant donné que le pH conditionne largement cette activité. Un bas pH favorise une destruction rapide des microorganismes cibles (Kabara, 1993).

- En ce qui concerne les bactériocines des bactéries lactiques (voir chapitre IV), de nombreuses recherches ont étudié le comportement antagoniste de ces bactéries, ce qui a amené à l'identification et à la caractérisation de nombreuses bactériocines issues de ces bactéries ayant un potentiel d'application dans les produits alimentaires (tableau 05). Étant donné leur caractère naturel du fait qu'elles aient été directement isolées d'aliments, les recherches se sont orientées vers la bio-préservation afin de répondre aux nouveaux besoins du marché pour des aliments naturels et dont l'innocuité est assurée, notamment concernant les produits prêts à consommer (Kelly *et al.*, 1996).

Tous ces métabolites compétitifs produits par les bactéries lactiques contribuent à limiter le développement microbien. Ils ont cependant un large spectre d'action et peuvent de ce fait aussi inhiber des bactéries d'intérêt dans les produits alimentaires (bactéries probiotiques par exemple).

3.1. La bio-conservation par les bactériocines des bactéries lactiques

La bio-conservation (ou bio-préservation) est une nouvelle approche de conservation basée sur l'utilisation de méthodes impliquant des conservateurs naturels et/ou biologiques et qui est dorénavant préconisée dans l'industrie alimentaire. Ces conservateurs ont généralement une origine microbienne ou font partie des structures intrinsèques de l'aliment et contribuent à sa conservation (lysozyme de l'oeuf, immunoglobulines et lactoferrine du lait, etc.). Plus précisément, la bio-préservation utilise des microorganismes antagonistes ainsi que leurs métabolites (acides organiques, peroxyde d'hydrogène, diacétyl, bactériocines, etc.) pour inhiber ou détruire les microorganismes indésirables dans les aliments (Rodgers, 2001). Les aliments fermentés sont un bon exemple de produits faisant appel à la bio-préservation et ce, par la croissance et le métabolisme de bactéries lactiques et les conditions que celles-ci imposent dans ce type d'aliment (pH bas,

compétition, etc.) (Ray et Daeschel, 1992 ; Bourgeois et Larpent, 1996). Les bactéries lactiques sont donc les acteurs essentiels de cette bio-préservation.

Parmi les nouvelles stratégies de conservation, notons l'application des nouvelles techniques physiques dites de pasteurisation ou de stérilisation à froid (hautes pressions, champs électriques et magnétiques pulsés) en combinaison avec les bactériocines (Deegan *et al.*, 2006). Le changement de l'intégrité de la structure membranaire des microorganismes pathogènes à Gram négatif induit par ces traitements pourrait permettre ensuite leur contrôle par les bactériocines, généralement plus actives contre les bactéries Gram-positives. Cependant, ces traitements ne peuvent être appliqués

Qu'à certains types de produits, notamment les aliments liquides (Abee *et al.*, 1995; Deegan *et al.*, 2006).

Dans le cas des aliments crus ou prêts à consommer, la réfrigération ne peut pas constituer à elle seule une barrière suffisamment efficace pour contribuer au contrôle des microorganismes pathogènes psychrotrophes. Les bactéries bactériocinogènes ou leur bactériocines semblent être plus efficaces à ces températures. Dès lors, l'exploitation et l'utilisation de cette flore lactique et/ou de ses bactériocines pour la bio-préservation dans ce type de produit paraît être une avenue prometteuse et suscite d'ailleurs un grand intérêt dans l'industrie agro-alimentaire (Leroi *et al.*, 1996).

De nombreux travaux de recherche ont évalué le potentiel des bactériocines ou de leurs souches productrices pour le contrôle des microorganismes indésirables dans les aliments. De manière générale, la sélection de souches productrices de bactériocines pour une application alimentaire doit obéir à un certain nombre de critères législatifs et technologiques. Ces bactéries doivent être reconnues GRAS, elles doivent démontrer une stabilité au pH (acide notamment), produire activement leurs bactériocines aux conditions de conservation appliquées, produire des arômes neutres qui n'affecteront pas les caractéristiques sensorielles du produit et respecter les normes microbiologiques.

L'application des bactériocines dans les produits laitiers, carnés et végétaux a été largement étudiée. Les produits laitiers, particulièrement le fromage est un exemple d'application de la nisine Z pour le contrôle de *L. monocytogenes*, qui pose un sérieux problème durant la production et la maturation fromagère (Benech *et al.*, 2002). Pour sa part, la nisine A a été étudiée pour l'inhibition de la flore d'altération dans la viande (Cutter et Siragusa, 1998). Plus récemment, la recherche sur l'utilisation de la nisine dans la bio- préservation a porté sur son addition sous forme concentrée (Nisapline™) plutôt que son introduction par l'intermédiaire de cultures vivantes. Dans les produits carnés, certaines souches de *Lactobacillus* et *Pediococcus* productrices de bactériocines de classe IIa *anti-Listeria* telles que la pediocine, constituent une meilleure approche de bio-préservation de ce type de produit du fait que ces souches représentent la microflore dominante des produits carnés sous atmosphère modifié (Abee *et al.*, 1995).

Le potentiel de la nisine appliquée seule ou en combinaison avec d'autres substances (CO₂, lactate de sodium) et de sa souche productrice (*Lc. lactis* subsp. *lactis*) a déjà été étudié dans les produits marins (Nilsson *et al.*, 1997; Nykanen *et al.*, 2000). Toutefois, la croissance de cette souche et la production de nisine *in situ* aux conditions de réfrigération est limitée, d'autant plus qu'elle perd son activité lorsque le pH est proche de 7 (Delves-broughton *et al.*, 1996). D'autres souches de bactéries lactiques et/ou leurs bactériocines ont été étudiées dans les produits marins prêts à consommer (crevettes, saumon fumé). Parmi elles, on peut citer *Lactobacillus sakei* productrice de sakacine P (Nilsson *et al.*, 1999; Katla *et al.*, 2001), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 productrice de nisine (Wessels et Huss, 1996) ou encore les souches bioprotectrices *Leuconstoc ssp.* et *Lb. plantarum* (Jeppesen et Huss, 1993).

3.2. Les stratégies d'utilisation des bactériocines dans les aliments

Il existe trois modes d'addition des bactériocines pour la bio-préservation des aliments :

- Elles peuvent être ajoutées en tant qu'auxiliaire technologique, c'est-à-dire par l'ensemencement d'une souche de bactérie lactique bactériocinogène qui produira sa bactériocine *in situ* dans l'aliment.
- Elles peuvent être aussi utilisées directement dans le produit comme additif sous forme purifiée ou semi-purifiée.
- La troisième stratégie, qui est d'ailleurs très peu exploitée, consiste à utiliser les bactériocines sous forme d'ingrédient concentré non purifié, issu de la fermentation d'une souche productrice de bactériocine (Deegan *et al.*, 2006).

3.2.1. Ajout de bactéries lactiques bactériocinogènes

Les avantages de l'utilisation de bactéries lactiques bactériocinogènes dans un aliment sont nombreux. Cela permet d'une part une conservation biologique sans avoir recours aux additifs chimiques, étant donné le statut GRAS de ces bactéries (Rodgers, 2001). Elles donnent donc une image naturelle au produit en question. D'autre part, la croissance de ces bactéries est régulée par la température et permet la production continue de bactériocine *in situ* dans la matrice alimentaire, ce qui réduit les problèmes liés à la décomposition et à l'adsorption des bactériocines aux constituants

alimentaires lorsqu'elles sont ajoutées directement au produit. Cependant, ces bactéries ne doivent pas altérer les caractéristiques organoleptiques et sensorielles de l'aliment dans le cadre de leur utilisation dans un produit non fermenté (Abee *et al.*, 1995; Rodgers, 2001).

3.2.2. Ajout de bactériocines pures ou semi-purifiées

L'ajout de bactériocine pure ou semi-purifiée directement dans l'aliment permet généralement une inhibition rapide des microorganismes indésirables. Cependant, il n'en demeure pas moins que sous cette forme, elles sont peu stables dans la matrice alimentaire. Par ailleurs, l'utilisation de bactériocine pure n'est pas une stratégie attrayante pour l'industrie car celle-ci doit être préalablement approuvée en tant qu'additif alimentaire par la législation. De plus, le rendement de purification des bactériocines est faible (de l'ordre de 50 à 100 µg/ml), ce qui rend leur utilisation difficilement accessible en terme de quantité, en plus d'être coûteuse (Naghmouchi, 2007).

3.2.3. Ajout de bio-ingrédient concentré à base de bactériocine

Très peu de bactériocines ont été développés en tant qu'ingrédients dans les aliments. La NisaplineTM est le seul exemple d'ingrédient concentré non purifié issu de techniques de grade alimentaire et qui est actuellement utilisé en tant qu'additif alimentaire. La NisaplineTM provient de la fermentation de lait écrémé avec la souche productrice de nisine, *Lactococcus lactis* et elle est utilisée de manière efficace dans plusieurs applications alimentaires. Cependant, étant donné qu'elle apparaît inefficace dans certaines applications, il est donc nécessaire de développer de nouveaux ingrédients pour leur utilisation dans certains types de produits alimentaires. La pediocine PA-1/AcH (Rodriguez *et al.*, 2002) et la lacticine 3147 (*Lc. Lactis* DPC 3147) (Morgan *et al.*, 1999) ont aussi été testées en tant que bio-ingrédients dans différents produits laitiers mais ne sont pas encore appliquées en industrie.

3.3. Facteurs influençant l'action des bactériocines de bactéries lactiques

Les potentiels d'application des bactériocines dans l'alimentation humaine sont limités par des propriétés propres à chaque bactériocine (spectre d'inhibition, stabilité thermique, solubilité, propriétés physico-chimiques, etc.). La baisse de leur efficacité dans les matrices alimentaires a de même été démontrée et serait due à leur attachement probable avec certains composés organiques du produit, ou encore leur inactivation par les protéases contenues dans l'aliment et/ou celles d'origine

microbienne (Nilsson *et al.*, 1999). Par ailleurs, les facteurs intrinsèques des aliments tels le pH, le contenu en lipides, ou la présence d'enzymes protéolytiques et les facteurs extrinsèques comme la température, le type de microorganisme à contrôler ainsi que sa concentration initiale exercent tous une influence sur l'efficacité des bactériocines. Aussi, leur stabilité est différente suivant le type de matrice alimentaire et la forme sous laquelle elles sont ajoutées (purifiées, semi-purifiées, lyophilisées, etc.). Par exemple, l'activité de la nisine ou de l'acidocine CH5 est considérablement réduite dans des aliments ayant une teneur élevée en gras (Davies *et al.*, 1999; Chumchalova *et al.*, 1998).

Par ailleurs, l'adsorption des bactériocines aux constituants des aliments et les conditions qui déstabilisent leur activité biologique telles que la dégradation protéolytique ou l'oxydation, ont été rapportées par plusieurs travaux (Schillinger *et al.*, 1996; Holzapfel *et al.*, 1995; Katla *et al.*, 2001a; Chen et Hoover, 2003). Dans leur étude, Duffes *et al.*, (2000) ont observé un transfert de l'activité de la bactériocine de la chair vers l'emballage durant la conservation du saumon fumé à froid. Les bactériocines peuvent aussi s'adsorber aux protéines de la matrice alimentaire par des ponts ioniques ou hydrophobes. Par exemple, l'addition de caséine a réduit l'activité de la sakacine P, de la curvacine et de la nisine dans des milieux synthétiques (Ganzle *et al.*, 1999).

Les bactériocines sont amphiphiles, chargées positivement et ont un contenu élevé en acides aminés hydrophobes. Leur attachement aux macromolécules chargées ou hydrophobes des aliments peut donc être envisagé. Ainsi, des travaux ont rapporté que l'activité de la sakacine P avait diminué durant la conservation du saumon fumé (Aasen *et al.*, 2003). Etant donné que l'addition d'urée a permis un recouvrement total de son activité, les mêmes auteurs ont attribué cette perte d'activité à une activité protéolytique mais aussi à l'adhérence de la sakacine à l'interface entre le gras et l'eau.

CONCLUSION GENERALE

Dans notre travail, nous avons d'abord isolé des bactéries lactiques à partir de laits fermentés de façon artisanal, produits par des ateliers avoisinantes de la région de Tébessa. Ces bactéries une fois isolées ont fait l'objet d'études approfondies pour bien les identifier et les caractériser.

Les tests d'identification auxquels l'ensemble des souches isolées étaient soumises ont permis de cribler 132 souches lactiques à partir de 48 échantillons de lait fermenté de façon artisanal et appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*. Certaines espèces appartenant à ces genres sont connues pour leur rôle en industrie laitière, notamment les espèces ; *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Sreptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lb. delbrueckrii* subsp. *lactis* et *Lb. casei* subsp. *casei*.

En ce qui concerne l'isolement de bactéries lactiques bactériocinogènes et sur un total de 132 souches lactiques criblées pour la production d'agents inhibiteurs en employant deux méthodes (la méthode de diffusion en puits et la méthode de double couches), 92 ont présenté une activité antagoniste dirigée contre *L. monocytogenes* ATCC7644. Le nombre de bactéries productrices de bactériocines isolées des échantillons testés montre que le choix effectué en allant rechercher ce type de bactéries dans ces produits est un choix judicieux. Nos résultats corroborent les travaux antérieurs puisque les produits alimentaires en général, et ceux fermentés de façon artisanale en particulier, constituent une niche écologique de choix pour l'isolement de bactéries lactiques productrices de bactériocines. Ces souches qui peuvent être sélectionnées non seulement sur la base de leurs performances technologiques mais également en prenant en compte d'autres propriétés (e.g. l'aptitude à améliorer la qualité microbiologique et la stabilité du produit fini) peuvent être utilisées comme des cultures starters.

Parmi l'ensemble des bactéries isolées, 5 souches dénommées, *Lb. curvatus* LB65, *Lb. brevis* LB93, *Lb. plantarum* LB44, *Lc. lactis* subsp. *Lactis* RB22, et *Lc. lactis* subsp. *Lactis* JB31, ont particulièrement attirées notre attention puisqu'elles produisent des facteurs antimicrobiens autres que les acides organiques.

Les substances anti-microbiennes produites par les 05 souches bactériennes sélectionnées répondent aux critères retenus par Klaenhammer (1988) et Tagg *et al.* (1976), et peuvent donc être considérées comme des bactériocines.

Suivant leur sensibilité aux différents traitements enzymatiques et physicochimiques, les bactériocines étudiées peuvent être classées en deux catégories :

- ✦ Des complexes protéiques hétérogènes pouvant regrouper des fonctions lipidiques et/ou glucidiques (cas de la bactériocine produite par *Lc. lactis* subsp. *Lactis* JB31).
- ✦ Des substances sensibles uniquement aux protéases testées et donc à structure protéique probablement homogène (cas des bactériocines produites par les 4 autres souches).

Toutefois nous avons constatés que les bactériocines produites par les souches *Lb. plantarum* JB44 *Lb. curvatus* LB65 et *Lb. brevis* LB93 ont un spectre d'activité qui englobe également des genres bactériens Gram+ (*Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Micrococcus* et *Staphylococcus*), ces bactériocines se sont montrés thermorésistants à la chaleur, puisqu'elles conservent leur activité après avoir été soumise à des traitements thermiques comparables à l'autoclavage (10 minutes à 121°C). Cependant les bactériocines perdent plus de 50% de leur activité à un pH inférieur à 3 ou supérieur à 11. L'étude de l'effet du traitement thermique combiné au pH à également montré que les bactériocines produites par les lactobacilles montrent une thèrmorésistance à 121°C lorsque le pH se situé entre 5 et 7.

Le spectre d'activité des bactériocines produite par les lactocoques semble être assez large, comparé à celui de la plupart des bactériocines, s'étendant à la majorité des genres de bactéries Gram+ testées. La bactériocine de la souche *Lc. lactis* subsp. *Lactis* JB31 est inactivée par toutes les enzymes testées, protéolytiques ou non, sauf la catalase. La structure chimique de la bactériocine (ou de son site actif) est donc probablement complexe, contenant, en plus de groupements protéiques, des entités de nature lipidique et polysaccharidique.

Lactobacillus curvatus LB65, souche isolée à partir de lait fermenté traditionnellement 'Raib', produit un agent antibactérien de nature protéique et présente un spectre d'action centré sur les espèces phylogénétiquement proches du microorganisme producteur. Cette étude a ainsi permis de démontrer que la bactériocine possède un spectre d'activité étendu.

La purification de la curvaticine LB65 a été effectuée à partir du surnageant de culture de *Lb. curvatus* LB65, prélevé en début de phase stationnaire. Le protocole de purification combine une précipitation au sulfate d'ammonium, une chromatographie d'échanges de cations et une chromatographie liquide haute performance en phase inverse. L'activité de la bactériocine étant mesurable dans le surnageant de la culture bactérienne de la souche *Lb. curvatus* LB65, on a pu passer à la purification de la protéine. Les échantillons lyophilisés et concentrés par précipitation ont été dialysés. Les chromatographies sur résine de QAE sephadex A-25 et par HPLC sur échangeur anionique DEAE, sont les deux méthodes les plus prometteuses en vue d'une éventuelle purification de la bactériocine. Les étapes de purification réalisées ont permis de faire passer l'activité spécifique de la bactériocine de 16,39 à 4266,66 U.A/mg, avec un rendement final de 0.4%.

La curvaticine LB65 purifiée a été soumise à une séparation par l'électrophorèse SDS-PAGE, dans le but d'estimer son poids moléculaire. En effet, Le poids moléculaire de la bactériocine a été estimé à 3,2 KDa.

La nature protéique de la curvaticine LB65 concentrée a été confirmée par la perte de son activité à la suite d'un traitement aux protéases, elle est également thermorésistante (121°C, 10 min) et stable dans une large gamme de pH

L'étude des bactériocines dirigées contre des souches pathogènes, pourrait aboutir à leur utilisation comme agents naturels pour une meilleure conservation des produits alimentaires fermentés. Cette application, en cours avec la nisine, doit être développée par l'apport de nouvelles bactériocines. Une meilleure compréhension de leurs propriétés physiques et chimiques, de leur production et de leur mode d'action est nécessaire afin d'optimiser cette utilisation.

Références bibliographiques

1. Aasen, I. M., Markussen, S., Moretro, T., Katla, T., Axelsson, L et Naterstad, K. (2003). Interactions of the bacteriocin sakacin P and nisin with food constituents. *Int. J. Food Microbiol.* **87**: 35-43.
2. Abee, T. (1995). Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiol. Lett.* **129**:1-10
3. Abee, T., Krockel, L et Hill, C. (1995). Bacteriocins: modes of action and potentials in food préservation and control of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.* **28**: 169-185.
4. Abelyan, V.A et Abelyan, L.A. (1997). Production of immobilized cells of *Sporolactobacillus inulinus* in a contenuously filling fermenter. *Appl. Biochem. Microbiol.* **33**:205-207.
5. Accolas, J. P., Hemme, D., Desmazeaud, J.M.,Vassal, L., Bouillanne.C et Monique,V. (1980).Les levains lactiques thermophiles, propriétés et comportement en technologie laitière. *Le lait*, **60**: 487-524.
6. Accolas, J.P., Thuault, T et Bourgeois, C. M. (1991). Propriétés inhibitrices des bacteries lactiques, application à la conservation des produits carnés. *Actes du colloque lactic 1991, ADRIA, Normondie. universite de Caen*,pp.1-13.
7. Adams, M.R et Marteau P. (1995). On the safety of lactic acid bacteria from food. *Int. J. Food Microbiol.* **27**: 263-264.
8. Aguirre, M et Collins, M.D. (1993). Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J. Appl. Bacteriol.* **75**: 95-107.
9. Aguirre, M et Collins, M.D. (1992). Phylogenetic analysis of some *Aerococcus*-like organisms for urinary tract infections: description of *Aerococcus urinae* sp. nov. *J. Gen. Microbiol.*, **138**: 401-405.
10. Altermann, E., Russell, W.M., Azcarate-Peril, M.A., Barrangou, R., Buck, B.L., McAuliffe, O., Souther, N., Dobson, A., Duong, T., Callanan, M., Lick, S., Hamrick, A., Cano, R. et Klaenhammer, T.R. (2005). Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**: 3906-3912.
11. Amiel, R.I., Mariey, M.C., Curk-Daubié. P et Travert, J (2000). Potentiel of fourier infrared spectroscopy (FTIR) for discrimination and identification of dairy lactic acid bacteria. *Le lait.* **80**: 445-459.
12. Amrouche, T (2005). Contribution à l'étude du pouvoir immunomodulateur des bifidobactérie: Analyse *in vitro* et étude *ex vivo* des mécanismes moléculaires impliqués. Thèse de Doctorat. Faculté des études supérieures de l'Université Laval.245p.

13. Anderssen, E. L., Bao Diep, D., Nés, I. F., Eijsink, V. G. H et Nissen-Meyer, J. (1998). Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricin EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2269-2272.
14. Andersson, R. (1986). Inhibition of *staphylococcus aureus* and spheroplasts of Gram-negative bacteria by an antagonistic compound produced by a strain of *Lactobacillus plantarum*. *Int. J. Food Microbiol.*, **3**:149-160.
15. Andersson, R. (1986). Inhibition of *staphylococcus aureus* and spheroplasts of Gram-negative bacteria by an antagonistic compound produced by a strain of *Lactobacillus plantarum*. *Int. J. Food Microbiol.* **3** :149-160.
16. Arihara, K., Cassens, R.J et Luchansky, J.B. (1993). Characterization of bacteriocins from *Enterococcus faecium* with activity against *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*, **19**:123-134.
17. Aslim, B., Yuksekdog, Z.N., Sarikaya, E et Beyatli, Y. (2005). Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. *Food Science and Technology* **38**: 691-694.
18. Atrih, A., Rekhif, N., Millere, J.B. et Lefebvre, G. (1993). Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. *Can. J. Microbiol.*, **39**:1173-1179.
19. Axelsson, L. (1998). Lactic acid bacteria: Classification and physiology. *In*: Lactic acid bacteria. Ed. S. Salminen and A. von Wright. Marcel Decker. p. 1-72.
20. Ayad, E. H. E., Nashat, S., El-Sadek, N., Metwaly, H. et El-Soda, M. (2004). Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. *Food Microbiology*, **21**: 715-725.
21. Bailey, F. J et Hurst A. (1971). Préparation of a highly active form of nisin from *Streptococcus lactis*. *Can. J. Microbiol.* **17**: 61-67.
22. Barefoot S.F. et Klaenhammer, T.R. (1983). Detection and activity of lacticin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45** :1808-1815.
23. Baty, D., Pattus, F., Parker, M., Benedetti, H., Frenette, M., Bourdineaud, J. P., Cavard, D., Knibiehler, M. et Lazdunski. C. (1990). Uptake across the cell envelope and insertion into the inner membrane of ion channel-forming colicins in *Escherichia coli*. *Biochimie.* **72**: 123-130.
24. Bauer, R et Dicks, L. M. (2005). Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *Int. J. Food Microbiol. Rev.* **101**: 201-216.
25. Benech, R. O., Kheadr, E. E., Lacroix, C et Fliss, I. (2002). Antibacterial activities of nisin Z encapsulated in liposomes or produced *in situ* by mixed culture during Cheddar cheese ripening. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:5607-5619.

26. Benoit, V., Mathis, R. et Lefebvre, G. (1994). Characterization of brevicin 27, a bacteriocin synthesized by *Lactobacillus brevis* SB27. *Curr. Microbiol.* **28** : 53-61.
27. Berthier, F. et Ehrlich, S.D. (1998). Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region. *FEMS. Microbiol. Lett.* **161**: 97-106.
28. Beukes, M. et Hastings, J.W. (2001). Self-protection against cell wall hydrolysis in *Streptococcus milleri* NMSCC 061 and analysis of the millericin B operon. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3888-3896.
29. Bhunia, A.K., Johnson, M.C. et Kalchayanand, N. (1991). Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. *J. Appl. Bacteriol.*, **70**: 25-33.
30. Bhunia, A.K., Johnson, M.C., Ray, B. et Belden, E.L. (1990). Antigenic property of pediocin AcH produced by *Pediococcus acidilactici* H.J. *Appl. Bacterio.* **169** : 211-215.
31. Bibel, D. J. (1988). Elie Metchnikoff's bacillus of long life. *ASM News* , **54**: 661-665.
32. Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarme K., Weissenbach, J., Ehrlich S. D. et Sorokin, A. (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* **11**: 731-753.
33. Bouksaim, M., Fliss, I. Meghrous, J., Simard, R.E. et Lacroix, C. (1998). Immunodot detection of nisin Z in milk and whey using enhanced chemiluminescence. *J. Appl. Microbiol.* **84**: 177-184
34. Bourgeois, C.M. et Larpent, J.P. (1996). Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentations alimentaires. Tome 2, pp. 523.
35. Bousfield, I.J., Keddie, R.M., Dando, T.R. et Shaw, S. (1985). Simple rapid methods of cell wall analysis as an aid in the identification of aerobic coryneform bacteria. In: Goodfellow, M., Minnikin, D.E. (Ed), *chemical Methods in Bacterial Systematics*. Academic Press, London, pp. 222-234.
36. Breukink, E. et de Kruijff, B. (1999). The lantibiotic nisin: a special case or not. *Biochim Biophys Acta.* **1462**: 223-234.
37. Brison, J. (1971). *Techniques d'enzymologie bactérienne* Masson & CIE éditeurs, 286 p.
38. Broadbent, J.R., Chou, Y.C., Gillies, K. et Kondo, J.K. (1989). Nisin inhibits several gram-positive, mastitis-causing pathogens. *J. Dairy Sci.* **72**: 342-5.
39. Brötz, H., Bierbaum G., Leopold, K., Reynolds, P. E. et Sahl, H.G. (1998). The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. *Antimicrob. Agents Ch.* **42**: 154-160.

40. Bukowska, H., Pieczul-Mroz, J., Jastrzebska, M., Chelstowski, K et Naruszewicz, M. (1998). Decrease in fibrinogen and LDL-cholesterol levels upon supplementation of diet with *Lactobacillus plantarum* in subjects with moderately elevated cholesterol. *Atherosclerosis*, **137**: 437–438.
41. Burianek, L. L et Yousef, A. E . (2000). Solvent extraction of bacteriocins from liquids cultures. *Lett. Appl. Microbiol.* **31**: 193-197.
42. Buzby, J.C et Roberts, T. (1997). Economic costs and trade impacts of microbial foodborne illness. *World Health Stat.* **83** :57-66.
43. Carbonnelle, B., Denis, F., Mannonier, A., Binon, G et Vargiver, K.(1990). Bactériologie médicale. *Techniques visuelles*, pp.23.
44. Carminati, D., Giragga, G. et Carini, S. (1989). Comportement de *Listeria monocytogenes* en présence de *Streptococcus lactis* producteurs de substances de type bactériocine. *Microbiol. Alim. Nutr.* **7** : 293-301.
45. Chamba, J. F., Duong. C, Fazel. A et Prost. F. (1994). Sélection des bactéries lactiques. *In- Bactéries lactiques: aspects fondamentaux et technologiques* .(H. Deroisart,& E. M. Luquet, éd.), *Technique & Documentation, Lorica, Paris*, **01**: 499-518.
46. Champnier-Verges, M.C., Chaillou, S., Cornet, M et Zagorec, M. (2002). Erratum to Lactobacillus sakei : recent and future prospects *R. Microbiol.***153** : 115-123.
47. Chen, H et Hoover, D. G. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Compreh. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2**: 82-99.
48. Chen, Q., Hu, J et Yun, X. X. (2006). Screening, isolation and identification of nisin resistance determinant gene in strains of *Lactococcus lactis*. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* **26**: 839-842.
49. Chumchalova, J., Josephsen, J. et Plockova, M. (1998). The antimicrobial activity of acidocin CH5 in MRS broth and milk with added NaCl, NaNO3 and lysozyme. *Int. J. Food Microbiol.* **43**: 33-38.
50. Cintas, L.M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nés, I.F. et Hernandez, P.E. (2001). Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food. Sci. Techol. Int.* **7**: 281-305.
51. Cintas, L.M., Casaus, P., Havarstein, L.S., Hernandez , P.E. et Nes, I.F. (1997). Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *App Environ Microbiol*, **63**: 4321-4330.
52. Collins, M. D., Williams, A. M. et Wallbanks, S. (1990). The phylogeny of *Aerococcus* and *Pediococcus* as determined by 16sr RNA sequence analysis:description of *Tétragenococcus*, gen, nov., *EFMS. Microbiol., Lett.*, **70**: 255-262.

53. Collins, M.D., Farrow, J.A.E., Phillips, B.A., Feresu, S. et Jones, D. (1987). Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some catalase negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus. *Carnobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**: 310-316.
54. Crandall, A. D et Montville, T. J. (1998). Nisin résistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 231-237.
55. Cutter, C.N. et Siragusa, G.R. (1996). Incorporation of nisin into a meat binding system to inhibit bacteria on beef surfaces. *Lett. Appl. Microbiol.* **27**: 19-23.
56. Daba, H., S. Pandian, J. F., Gosselin, J., Huang, R. E., Simard et Lacroix, C. (1991). Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 3450-3455.
57. Dagry, M. K. (1996). Isolement et caractérisation de mutants résistants à la mutacine B-Ny266. Mémoire de maîtrise. Université Laval. 61p.
58. Davey, G. P et Richardson, B. C. (1981). Purification and some Properties of Diplococcin from *Streptococcus cremoris* 346. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**: 84-89.
59. Davies, E.A., Milne, C.F., Bevis, H.E., Potter, R.W., Harris, J.M., Williams, G.C., Thomas, L.V. et Delves-Broughton, J. (1999). Effective use of nisin to control lactic acid bacterial spoilage in vacuum-packed Bologna-type sausage. *J. FoodProt.* **62**: 1394-1403.
60. Daw, M.A. et Falkiner, F.R. (1996). Bacteriocins: nature, function and structure. *Micron.Review* **27**: 467-79.
61. De klerck, H.C et Coetzee, J.N, (1961). Antibiosis among lactobacilli. *Nature*, **192** : 340-341.
62. De Kwaadsteniet, M., Todorov, S.D., Knoetze, H. et Dicks, L.M.T. (2005). Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **105**:433-444
63. de Man, J.C., Rogosa, M et Sharpe, M.E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* **23**: 130 - 135.
64. De Vos, W. M., Kuipers, O. P., van de Meer, J. R et Siezen, R. J. (1995). Maturation pathway of nisin and other lantibiotics: post-translationally modified antimicrobial peptides exported by Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **17**: 427-437.
65. De Vuyst, L et Vandamme. J. (1994). Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and application. 151-221 In L. De Vuyst and E. J. Vandamme (eds.), *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and applications*. Blackie Académie and Professional. London, UK.
66. Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, P. (2006). Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* **16**: 1058-1071.

67. Delves-Broughton, J. (1990). Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.* **11** : 100-113.
68. Delves-Broughton, J. (2005). Nisin as a food preservative. *Food Aust.* **57**: 525-527
69. Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J. and Hugenhoitz, J. (1996). Applications of the bacteriocinnisin. *Ant. Van Leeuwenhock.* **69**: 193-202.
70. Deroissart, H. B. (1994). Les bactéries lactiques. *In-Laits et produits laitiers*, Vol. 3. (F. M. Luquet , éd.). *Technique et documentation Lavoisier, Paris*, pp. 343-407.
71. Desmazeaud, M (1992). Les bactéries lactiques. *In-Les groupes microbiens d'intêret laitier* (Hermier, J., Lenoir, J & Weber, F , eds.). *C.E.P.I.L. Technique & Documentation. Lavoisier*.pp.9-60
72. Desmazeaud, M. (1991). Les bactéries lactiques, recherche et application industrielle en industries agro-alimentaires. *Actes du colloque lactic 91. Adria, Normandie*, pp.59-66.
73. Dodd, H. M., Horn, N et Gasson, M. J. (1990). Analysis of the genetic determinants for the production of the peptide antibiotic nisin. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 555-556.
74. Dodd, H. M., Horn, N., Swindell, S et Gasson, M. J (1991). Nisin biosynthesis genes are encoded by a novel conjugative transposon. *Mol. Gen. Genet.* **228**: 129-135.
75. Dortu, C (2008). Isolement d'une bactérie lactique produisant de la sakacin G et utilisation sur des matrices alimentaires. Thèse de Doctorat en sciences agronomiques et ingénierie biologique. Faculté universitaire des sciences agronomiques de Gembloux.
76. Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L. M. et Prévost, H. (2006). The continuing story of class Ha bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**: 564-582
77. Driessen, A.J.M. Von der Hooven, H.W., Kuiper, W. Van de Kamp, M., Sahl H.G., Koning, R.N.H et Konings, W. (1995) .Mechanistic studies of lantibiotic induced permeabilization of phospholipid vesicles. *Biochem*, **34** : 1606-1614 .
78. Drugeon, H.B., Juven, M.E., Caillon, J., Contieu, A.L. (1987). Assessment of formulas for calculating concentration by the agar diffusion method. *Antimicrob. Agents. Chemother*, **31** : 870-875.
79. Duffes, F., Jenoe, P & Boyavai, P. (2000). Use of two-dimensional electrophoresis to study differential protein expression in divercin V41-resistant and wild-type strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4318-4324.
80. Dutka-Malen, S., Evers, S et Courvalin, P. (1995). Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification of the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 24-27.

81. Dykes, G. A., Cloete, T. E et von Holy, A. (1995). Taxonomy of lactic acid bacteria associated with vacuum-packaged processed meatspoilage by multivariate analysis of cellular fatty acids. *Int. J. Food Microbiol.* **28**: 89-100.
 82. Ecker, K.F. (1992). Bacteriocin and food applications. *Dairy Food Environ. Sanit.* **12**: 204-209.
 83. Eijsink, V.G.H., Skeie, M., Middelhoven, P. H., Brurberg, M. B et Nés, I. F. (1998) Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3275-3281.
 84. Enan, G., EL-Sayed, M.A., EL-Essawy A.A. et Debevere, J., (1994). Production and characterization of a bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* UG1. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.* **59** : 1795-1811.
 85. Ennahar, S., Deschamps, N et Richard, J. (2000b). Natural variation in susceptibility of *Listeria* strains to class IIa bacteriocins. *Curr. Microbiol.* **41**: 1-4.
 86. Ennahar, S., Sashihara, T, Sonomoto, K et Ishizaki, A. (2000a), Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.*, **24**(1): 85- 106.
 87. Falahee, M.B., Adams, M.R., Dale, J.W. et Momis, B.A. (1990). An enzyme immunoassay for nisin. *Int. Food Sc Technol* **25** : 590-595.
 88. Farrow, J. A. E. et Collins, M. D. (1984). ADN-base composition, ADN-ADN homology and long-chain fatty acid studies on *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. *J. Gen. Microbiol.*, **130**: 357-362.
 89. FIL-Norme. (1991). Yaourt, identification des micro-organismes caractéristiques: *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* et *Sterptococcus. salivarius* subsp *thermophilus*. *Revue* **46**:1-4.
 90. Food and Drug Administration (1988). Nisin preparation: affirmation of GRAS status as direct human food ingredient. *United States Governmenr Federal Registry*, **53**: 1 1247.
 91. Fox, P. F. (1993). Cheese: an overview. *In* Cheese: chemistry, physics and microbiology, pp. 1-36. *Edited by P. F. Fox. London: Chapman and Hall.*
 92. Franzmann, P.D., Hôpfl, P., Weiss, N. et Tindall, B.J. (1991). Psychrotrophic, lactic acid producing bacteria from anoxia waters in Ace Lake, Antarctica; *Carnobacterium funditum* sp. nov. and *Carnobacterium alterfunditum* sp. nov. *Arch. Microbiol.* **156**: 255- 262.
 93. Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, **66**: 365-378.
 94. Fuller, R. (1992). History and development of probiotics. *The scientific basis*, p1-8.
- (Editeur: Fuller R) Chapman et Hall, London.

95. Gänzle, M.G., Weber, S. et Hammes, W.P. (1999). Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. *Int. J. Food Microbiol.* **46**: 207-217.
96. Gao, F. H., T. Abee et W. N. Konings. (1991). The mechanism of action of the peptide antibiotic nisin in liposomes and cytochrome C oxydase proteoliposomes. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2164-2170.
97. Garrity, G.M. et Holt, T.G. (2001). «Taxonomic Outline of the Archaea and Bacteria» p. 155-166. In D.R. Boone & R.W Castenholts (ed), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2^{eme} ed, vol. 1* (The Archaea and the deeply branching and phosphoric Bacteria). Springer- verlag, New York.
98. Garvie, E.I. (1986). Genus *pediococcus*. In-*Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol.2. (P. H .A. Sneath., N. S. Mair., M. E. Shar & K. G. Holt, éd.), *Williams & Wilkins, Baltimore*, pp. 1075-1079.
99. Gasser, F., Montel., M. C., Talon, R et Champoier, M (1994) .Taxonomie moléculaire appliquée à la classification des bactéries lactiques : In-Bactéries lactiques: aspects fondamentaux et technologiques . Vol .1. (H. Deroissart & F. M. Luquet, éd.), *Technique & Documentation, Loriga, Paris*,**1**:127-139.
100. Gatti, fornasari, Neviana. (2001). Differentiation of *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus delbruekii* subsp. *lactis* by SDS-PAGE of cell-wall proteins. *Lett. Appl. Microbiol.* **32**: 352-356.
101. Geis, A., Singh, J. et Teuber, M. (1983). Potential of lactic streptococci to produce bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**(1): 205-211.
102. Gilarova, R., Voldrich, M., Demnerova, K., Cerovsky, M et Dobias, J. (1994). Cellular fatty acids analysis in the identification of lactic acid bacteria. *Int. J. Food. Microbiol.* **24**: 315-319.
103. Gill, H. S., Rutherford K. J et Cross M. L. (2001). Dietary probiotic supplementation enhances natural killer activity in the elderly: An investigation of age-related immunological changes. *Journal of Clinical Immunology*, **21**: 264-271.
104. Gonzalez, B., Arca, P., Mayo, B et Suarez, J. E. (1994). Detection, purification and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2158-2163.
105. Gordin, BR et Gorbach, SL. (1992). Probiotics for humans. *The scientific basis*, p 355-376. (Editeur: Fuller R) Chapman et Hall, Londres.
106. Gosselink, M. P., Schouten, W. R., van Lieshout, L. M., Hop, W. C., Laman, J. D & Ruselervan Embden, J. G (2004). Delay of the first onset of pouchitis by oral intake of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Disease of Colon and Rectum*, **47** : 876-884.

- 107.** Gournier-château N., Larpent J. P., Castillanos M. I., & Larpent J. L., 1994. Les probiotiques en alimentation animale et humaine. Édition Technologie et documentation Lavoisier pp. 1-192, Paris, France.
- 108.** Gournier-château, N., Larpent, J.P., Castillanos, M.I., Larpent, J.L. (1994). Les probiotiques en alimentation animale et humaine. *Édition Technologie et documentation Lavoisier* pp. 1-192, Paris, France.
- 109.** Gratia, A. (1925). Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *C.R. Séances Soc. Biol. Fil.*, **93**: 279 1-2792.
- 110.** Gravesen, A., Ramnath, M., Rechinger, K. B., Andersen, N., Jansch, L., Hechard, Y., Hastings, J. W et Knochel, S. (2002). High-level résistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology*. **148**: 2361-2369.
- 111.** Gravesen, A., Serensen, K., Aarestrup, F. M et Knechel, S. (2001). Spontaneous nisin-resistant *Listeria monocytogenes* mutants with increased expression of a putative penicillin-binding protein and their sensitivity to various antibiotics. *Microb. Drug Resist.* **7**:127-135.
- 112.** Guandalini, S. (2002). Use of *Lactobacillus-GG* in paediatric Cohn's disease. *Digestive and Liver Disease*, **3** : 63-65.
- 113.** Guinane, C. M., Cotter, P. D., Hill, C et Ross, R. P. (2006). Spontaneous résistance in *Lactococcus lactis* IL1403 to the lantibiotic lacticin 3147. *FEMS Microbiol. Lett.* **260**: 77-83.
- 114.** Guiraud, J et Galzey, P. (1980). Analyse microbiologique dans les industries alimentaires. *Ed. Lusine nouvelle*, Paris, 236p.
- 115.** Gutmann, I et Wahlefield, A.W. (1974). L(+) lactate : détermination with lactic dehydrogenase and NAD. In. Bergemeyer, H.U. (Ed). *Methods of enzymatic analysis*. *Academic Press, New York*, pp. 1452-1456.
- 116.** Hamon , Y et Peron, Y. (1963), Quelques remarques sur les bactériocines produites par les microbes Gram-positifs. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **257**: 119 1-1193.
- 117.** Hanlin, R. T (1992). Index to gênera and species of ascomycetes described by A. P. Viegas. *Mycotaxon. Science* ,**43**: 207-230.
- 118.** Harkovirta, J., Reunanen, J. et Saris, P. E. J. (2006) Bioassay for nisin in milk, processed cheese, salad dressings, canned tomatoes, and liquid egg products. *Appl. Environ Microbiol.* **72**: 1001-1005.
- 119.** Hasper, H. E., Kramer, N. E., Smith, J. L., Hillman, J. D., Zachariah, C, Kuipers, O. P., De Kruijff, B et Breukink, E. (2006). An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid II. *Science*, **313**: 1636-1637

120. Hastings, J. W., Sailer, M., Johnson, K., Roy, K.L., Vederas, J. C et Stiles, M. E. (1991). Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *J. Bacteriol.* **173**: 7491-7500.
121. Héchard, Y. et Sahl, H.G. (2002). Mode of action of modified and unmodified bacteriocin from Gram-positive bacteria. *Biochimie*, **84**: 545-557.
122. Heng, N. C et Tagg J. R. (2006). What's in a name? Class distinction for bacteriocins. *Nature Reviews Microbiol.* **4**: 1-2.
123. Herranz, C et Driessen, A. J. (2005). Sec-mediated secretion of bacteriocin enterocin P by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 1959-1963.
124. Hirsch, A., Grinsted, E., Chapman, H.R et Mattick, A.T.R. (1951), A note on the inhibition of an anaerobic spore former in Swiss-type cheese by a nisin-producing *Streptococcus*. *J. Dais, Res.*, **18**(2): 205-207
125. Holck, A., Axelsson L., Birkeland, S-E., Aukrust, T et Blom, H. (1992). Purification and amino acid séquence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J. Gen. Microbiol.* **138**:2715-2720.
126. Holley, R.A., Guan, T.Y., Peirson, M. et Yost, C.K. (2002). *Carnobacterium viridans* sp. nov., an alkaliphilic, facultative anaerobe isolated from refrigerated, vacuum-packed bologna sausage. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 1881-1885.
127. Holo, H., Aymerich, T., Havarstein, L. S., Huga, M, Garriga M et Nés, I. F. (1996). Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1676-1682.
128. Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A, Stanley, J.T.et Williams, S.T. (1994). Group17, Gram-positive cocci: *In-Bergeye's manual of déterminative bacteriology*, Vol.1 (P. H. A. Snaeth,N. S. Mair,M. E. Sharpe, & J. G.Holt,éd.), *Williams & Wilkins, Baltimore*, pp. 527-557.
129. Holzappel, W. H., Geisen, R et Schillinger, U. (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.* **24**: 343-362.
130. Holzappel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J. et Schillinger, U (2000). Taxonomy and important feature of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutri.* **73**: 3655-3735.
131. Horn, N., Swindell, S., Dodd, H. et Gasson, M. (1991). Nisin biosynthesis genes are encoded by a novel conjugative transposon. *Mol. Gen. Genet.* **228**: 129-135.
132. Huben, K. J. A., Wuytack, E. Y., Soontjens, C. F et Michiels, C. W. (1996). High pressure transient sensitization of *Escherichia coli* to lysozyme and nisin by disruption of outer membrane permeability. *J. Food. Prot.* **59**: 350-359.

133. Hugenholtz, J., Kleerebezem, M., Starrenburg, M., Delcour, J., de Vos, W et Hols, P. (2000). *Lactococcus lactis* as a cell factory for high-level diacetyl. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** : 4112-4114.
134. Huss, H.H., Jorgensen L.V. et Vogel, B.F. (2000). Control options for *Listeria monocytogenes* in seafoods. *Int. Food. Microbiol.* **62**: 267-274.
135. Isolauri, E., Kirjavainen, P. V. et Salminen, S. (2002). Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation. *Gut*, **50**: 54-59.
136. Jack, R.W., Tagg, J.R. et Ray, B . (1995). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol Rev*, **59** : 171–200
137. Jacob, F., Lwoff, A., Siminovitch, A et Woolman, E. (1953), Définition de quelques termes relatifs à la lysogénie. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, **84**: 222-224.
138. Jarvis, B et Farr, J.(1971). Partial purification, specificity and mechanism of action of the nisin-inactivating enzyme from *Bacillus cereus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **227**: 232-240.
139. Jeppesen, V.F. et Huss, H.H. (1993). Antagonistic activity of two strains of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in a model fish product at 5°C. *Int. J. Food Microbiol.* **19**: 179-186.
140. Jiang, T., Mustapha, A. et Savaiano, D. A. (1996). Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacterium longum*. *Journal of Dairy Sciences*, **79**: 750-757.
141. Jimenez-Diaz R., Rios-sanchez, R.M., Desmazeaud, M., Ruiz-barba, J.L et Piard, J.L. (1993). Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59** : 1416-1424.
142. Jimenez-Diaz, R., Ruiz-Barba, J.L., Cathcart, D.P., Holo, H., Nés, I.F., Sletten, K.H. et Warner, J.P. (1995). Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 4459-4463.
143. Joborn, A., Dorsch, M., Olsson, J.C., Westerdhal, A et Kjelleberg, S. (1999). *Carnobacterium inhibens* sp. nov., isolated from the intestine of Atlantic salmon (*Salmosalar*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 1891-1898.
144. Joerger, M.C., et Klaenhammer, T.R. (1986). Characterization and purification of helveticin J and evidence for chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J. Bacteriol.* **167**: 439-446.
145. Joerger, W.C et Klaenhammer, T.R. (1990). Cloning, expression, and nucleotide sequence of the *Lactobacillus heveticus* 481 gene encoding the bacteriocin helveticin J. *J. Bacteriol.* **172**: 6339-6347.

- 146.** Kaiser, A.L. et Montville, T.J. (1993). The influence of pH and growth rate on production of the bacteriocin, bavaricin MN, in batch and continuous fermentations. *J.Appl. Bacteriol.* **75:** 536-540.
- 147.** Kalchayanand, N., Hanlin, M.B., Ray, B. (1992). Sublethal injury makes Gram-negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcH and nisin. *Lett. Appl.*
- 148.** Kandler, O et Weiss, N. (1986). Regular, nonsporing Gram-positive rods bacteria: *In-bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol.2.(P.H. A. Sneath., Mair, N., Scharpe, M. E., Holt. M. E., éd.). *Williams. & Wilkins ,Baltimore*, pp.1208-1260.
- 149.** Kanwar, S.S., Chadha, B.S., Tewari, H.K et Sharma V.K .(1995). Contenuous production of lactic acid from molasses by free and immobilized *Sporolactobacillus cellulosolvens*. *World J. Microbiolo. Biotechnol.* **11:** 687-688.
- 150.** Kashket, E. R. (1987). Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS. Microbiol. Rev.* **46:** 233-239.
- 151.** Katikou, P., Ambrosiadis, L., Georgantelis, D., Koidis, P et Georgakis, S.A. (2007). Effect of *Lactobacillus* cultures on microbiological, chemical and odour changes during storage of rainbow trout fillets. *J. Sci. Food Agric.* **87:** 477-484.
- 152.** Kato, T., Matsuda T., Yoneyama, Y., Kato, H et Nakamura, R. (1994). Antibacterial substances produced by *Enterococcus faecium*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58,** 411-412.
- 153.** Katla, A. K., Krusc, H., Johnscn, G., et Herikstade, H. (2001). Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* **67:**147-152.
- 154.** Ke, D., Picard. F.J., Martineau, F., Menard, C., Roy, P.H., Ouellette, M., Bergeron, M.G. (1999). Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J. Clin. Microbiol.* **37:** 3497-3503.
- 155.** Kelly, W. J., Asmundson, R.V et Huang, M.C. (1996). Isolation and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from ready-to-eat food products. *Int. J. Food Microbiol.* **33:**209-218.
- 156.** Keren, T., Yarmus, M., Halevy, G. et Shapira, R. (2004). Immunodetection of the bacteriocin lactacin RM: analysis of the influence of température and tween 80 on its expression and activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **70:** 2098-2104
- 157.** Kersters, K. (1985). Numerical methode in theclassification of bacteria by protein electrophoresis. Academic Press.
- 158.** Klaenhammer, T.R. (1988). Bacteriocins of lactics acid bacteria. *Biochem.* **70:** 337-349.

- 159.** Klaenhammer, T.R. (1993), Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **12**(1-3): 39-85.
- 160.** Kleerebezem M., Boekhorst J., van Kranenburg R., Molenaar D., Kuipers O.P., Leer R., Tarchini R., Peters S.A., Sandbrink H.M., Fiers M.W.E.J., Stiekema W., Klein Lankhorst
- 161.** R.M., Bron P.A., Hoffer S.M., Nierop Groot M.N., Kerkhoven R., de Vries M., Ursing B., de
- 162.** Kojic, M., Svircevic, A. J., Banina, A et Topisirovic, L. (1991). Bacteriocin-producing strain of *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* S50. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** : 1835-1837.
- 163.** Koort, J., Vandamme, U., Schillinger, U., Holzapfel, W.H et Bjorkroth, J. (2004). *Lactobacillus curvatus* subsp. *melibiosus* is a later synonym of *Lactobacillus sakei* subsp. *carneus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 1621-1626.
- 164.** Kozak, W., Bardowski, J et Dobežanski, W.T. (1978). Lactostreptocins-acid bacteriocins produced by lactic Streptococci . *J. Dairy Res.* **45**: 247-257.
- 165.** Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., Deruyter, P. G. G. A., Luesink, E. J et De Vos W. M. (1995). Auto-regulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal-transduction. *J. Biol. Chem.* **270**: 27299-27304.
- 166.** Larpent, J. P. (1987). Micro-organismes intervenant dans la fabrication et la maturation des fromages: leur rôle sur les propriétés organoleptiques. *In-Biotechnologie et industries laitières.*
- 167.** Larpent, J. P. (1989). Les bacteries lactiques. *In-Microbiologie alimentaire: les ferments alimentaires*, Vol. 2. (C. M. Bourgeois.& J. P. Larpent, éd.), *Technique & Documentation, Lavoisier, Apria*, pp.1-15.
- 168.** Larpent, J. P. (1990). Les fermentations alimentaires. *In-Microbiologie alimentaire, Technique & Documentation, Lavoisier, Apria*, **02**:3-17.
- 169.** Larpent, J. P. (1991). Les ferments microbiens dans les industries agro-alimentaires: (produits laitiers et carnés). *Technique & documentation, Lavoisier, Paris*, 241p.
- 170.** Larpent, J. P. (1993).Aliments fermentés et ferments microbiens. *L'information de biotechnicien*, **1**:19-21.
- 171.** Larsen, A. G et Norrung B. (1993). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. *Lett. Appl. Microbiol.* **17**:132-134
- 172.** Leclerc, H., Deveriese, L.A et Mmsel, D.A.A. (1996). Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. *J. Appl. Bacteriol.* **81**: 459-466.

173. Leer, R. J., van der Vossen, J. M. B. M., van Giezen, M., van Noort, J. M. et Pouwels, P. H. (1995). Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiology*. **141**: 1629-1635.
174. Leisner, J.J., Vancanneyt, M., Goris, G., Christensen, Het Rusul, G. (2000). Description of *Paralactobacillus selangorensis* gen. nov., sp. nov., a new lactic acid bacterium isolated from chilli bo. a Malisian food ingredient. *Int. J. Sys Evol. Microbiol.* **50**: 19-24
175. Leroi, F., Arebey, N., Joffraud, J.J et Chevalier, F. (1996). Effect of inoculation with lactic acid bacteria on extending the shelf-life of vacuum-packed cold smoked salmon. *Int. J. Food Sci. Technol.* **31**: 497-504.
176. Leveau, J. V., Bouix, M et Deroissart, H. (1991). Techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agro-alimentaires: le contrôle micro biologique, 2^{ème} édition, *Techniques & documentation, Lavoisier, Paris*, pp. 125-183.
177. Leveau, J. Y et Bouix, M. (1989). La flore lactique. *In- Guide pratique d'analyse micro biologique des lait et produits laitiers*. (Beerens, H & Luquet, F. M, édi.). *Tech Documentation, Lavoisier*, 250p
178. Lewus, C.B. et Montville, T.J, (1992b). Further characterization of bacteriocins plantaricin BN, bavaricin MN and pediocin A. *Food Biotechnol.* **6**: 153-174.
179. Lewus, C. B., Kaiser, A et Montville, T.J. (1992a). Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** : 1683-1688.
180. Li, C., Bai, J., Li, W., Cai, Z et Ouyang, F. (2001). Optimisation of conditions for bacteriocin extraction in PEG/salt aqueous two-phase Systems using statistical experimental designs. *Biotechnol. Prog.* **17**: 366-368.
181. Liao, C., Yousef, A.E., CHism, G.W. et Richter, E.R. (1993). Inhibition of *Staphylococcus aureus* in buffer, culture media and foods by lacidin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* OSU133. *J. Food Safety*, **14**: 87-101.
182. Lilly, D.M et Stillwell, R.H. (1965). Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*, **147**: 747-748.
183. Lindgren, S. E et Dobrogos, W. J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS. Microbiol.*, **87**:149-164.
184. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. et Randall, R.J. (1951). Protein measurement
185. Lùders, T., Birkemo, G. A., Fimland, G., Nissen-Meyer, J et Nés, I. F. (2003). Strong synergy between a eukaryotic antimicrobial peptide and bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1797-1799.

- 186.** Maftah, A., Renault, D., Vignoles, C., Héchard, Y., Bressolier, P., Ratinaud, M.H., Cenatiempo, Y et Julien, R. (1993). Membrane permeabilization of *Listeria monocytogenes* and mitochondria by the bacteriocin mesentericin YI 05. *J Bacteriol*, **75**: 3232-3235.
- 187.** Malik, R.K., Kumar, N., Nageswara rao, K et Mathur, D.K (1994). Bacteriocins-antibacterial proteins of lactic acid bacteria : a review. *Microbiol. Alim. Nutr.* **12** : 117-132.
- 188.** Mantovani, H. C. et Russell, J. B. (2003). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bovicin HC5, a bacteriocin produced by *Streptococcus bovis* HC5. *Int. J. Food Microbiol.* **89**:77- 83
- 189.** Marconi, E., Sorrentino, E., Mastrocola, E et Coppola, R (2000). Rapid detection of diaminopimelic acid in lactic acid bacteria by microwave cell wall hydrolysis. *J. Agric. Chem.* **48**: 3348-3351.
- 190.** Martinez- Muracia, A.J et Collins, M.D. (1990). Phylogenetic analysis of the genus *Leuconostoc* based reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS. Microbiol. Lett.* **70**: 73:84.
- 191.** Matsumoto, M et Benno, Y. (2004). Consumption of *Bifidobacterium lactis* LKM512 yogurt reduces gut mutagenicity by increasing gut polyamine contents in healthy adult subjects. *Mutation Research*, **568**: 147-153.
- 192.** Mattick, A. T. R et Hirsch, A.(1947). Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. *Lancet*, **2**: 5-8.
- 193.** Mayr-Harting, A., Hedges, J et Berkeley, R.C.W. (1972). Methods for studying bacteriocins. *Methods Microbiol.* **7**: 315-422
- 194.** Mazotta, A. S. et Montville, T.J. (1999). Characterization of fatty acid composition, spore germination, and thermal resistance in a nisin-resistant mutant of *Clostridium botulinum* 169B and in the wild-type strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 659-664
- 195.** McAuliffe, O., Ross, R.P et Hill, C. (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS. Microbiol Rev*, **25**: 285-308.
- 196.** McEntire, J. C., Carman, G. M et Montville, T. J. (2004). Increased ATPase activity is responsible for acid sensitivity of nisin-resistant *Listeria monocytogenes* ATCC 700302. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 2717-2721.
- 197.** McKay, L.L et Baldwin, K.A. (1990). Applications for biotechnology : present and future improvements in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **87** : 3-14.
- 198.** Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M et Tauxe, R.V.(1999). Food-related illness and death in the united states. *Emerg. Infedt. Dis.* **5**:607-625.
- 199.** Meghrou, J., Lacroix, C et Simard, R.E. (1999). The effects on vegetative cells and spores of three bacteriocins from lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* **16**: 105-114

200. Mercenier, A., Pavan, S et Pot, B. (2002). Probiotics as biotherapeutic agents: Present knowledge and future prospects. *Current Pharmaceutical Design*, **8**: 99-110.
201. Metchnikoff E., (1907). The prolongation of life. In *Optimistic Studies* (Heinemann W., Ed.), pp. 1-100. G. P. Putnam and Sons, London, UK.
202. Moll, G.N., Konings, W.N et Driessen, A.J.M. (1999) Bacteriocins: Mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **76**: 185-198.
203. Montel, M. C., Talon, R., Fournaud, J et Champomier, M.C. (1991). A simplified key of identifying homofermentative *Lactobacillus* and *Carnobacterium* spp. From meat. *J. Appl. Bacteriol.* **70** : 469-472.
204. Montel, M.C et Champomier, M.C. (1987). Arginine catabolism in *Lactobacillus sakei* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **53** : 2683-2685.
205. Mora, D., Scarpellini, M., Franzitti, L., Colombo, S et Galli, A. (2003). Reclassification of *Lactobacillus maltaromicus* (Miller et al., 1973) DMS 20342 (T) and DMS 20344 and *Carnobacterium piscicola* (Collins et al., 1987) DSM 20730 (T) and DSM 20722 *carnobacterium maltoromanicum* comb. Nov. *Int. J. S vst. Evol. Microbiol.* **53**: 675-678.
206. Morency, H., Mota-Meira, M., Lapointe, G., Lacroix, C et Lavoie, M. C. (2001). Comparison of the activity spectra against pathogens of bacterial strains producing a mutacin or a lantibiotic. *Can. J. Microbiol.* **47**: 322-331.
207. Morisset, D., Berjeaud, J.M., Frère, J et Héchar, Y. (2005). Bactériocines de bactéries lactiques. *In* Bactéries lactique et probiotiques. Luquet FM., Corrieu G , Edi Tec et Doc, La voisier. 352p.
208. Moroni, O (2007). Contribution à l'étude du rôle des probiotiques dans le contrôle et la prévention des infections entériques à *Listeria monocytogenes* : analyse in vitro et étude in vivo des mécanismes d'action antimicrobien. Thèse présentée à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval. 146p.
209. Morris, S. L., Walsh, R. C. et Hansen, J. N. (1984) Identification and characterization of some bacterial membrane sulfhydryl groups which are targets of bacteriostatic and antibiotic action. *J. Biol. Chem.* **259**: 13590-13594
210. Moschetti, G., Blaiotta, G., Villani, F et Copola, S. (2000). Specific detection of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Mesenteroides* with DNA primers identified by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 422-424.
211. Mota-Meira, M., Lapointe, G., Lacroix, C et Lavoie, M. C. (2000). MICs of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 24-29.
212. Mugochi, T., Nandakumar, M.P, Zvauya, R et Mattiasson, B. (2001). Bioassay for the rapid detection of bacteriocins in fermentation broth. *Biotechnol. Lett.* **23**: 1243-1247

213. Mulders, J. W. M., Boerrigter, I. J., Rollema, H. S., Siezen, R. J et Devos, W. M. (1991). Identification and characterization of lantibiotic nisin-Z, a natural nisin variant. *Eur. J. Biochem.* **201**: 581-584.
214. Mulet-Powell, N., Lacoste-Armynot, A. M., Vinas, M et Simeon de Buochberg, M. (1998). Interactions between pairs of bacteriocins from lactic bacteria. *J. Food Prot.* **61**: 1210-1212.
215. Muriana, P. M et Klaenhammer, T. R. (1991). Cloning, phenotypic, expression and DNA séquence of the gène for laticin F, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus* spp. *J. Bacteriol.* **173**: 1779-1788.
216. Muriana, P.M. et. Klaenhammer, T.R. (1991). Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 114-121.
217. Muto, A et Osawa, S. (1987). The guanine and cytosine content of genomic DANN and bacterial evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:166-169.
218. Naghmouchi, K. (2007). Divergicin M35, une nouvelle bactériocine produite par *Carnobacterium divergens* M35 : Caractérisation moléculaire du mécanisme d'action antimicrobien et du phénomène de résistance, Thèse de doctorat en Sciences et Technologie des aliments, la Faculté des études supérieures de l'Université Laval ,QUÉBEC.
219. Naumann, D., Fijala, V., Labischinski, H et Giesbrecht, P .(1988). The rapid differentiation and identification of pathogenic bacteria using Fourier transform infrared spectroscopic and multivariate statistical analysis. *L. Mol. Struct.* **174**: 165-170.
220. Nés, I. F., Diep, D. B., Havarstein, L. S., Brurberg, M. B., Eisink, V et Holo, H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* **70**: 113- 128.
221. Nés, I. F., Havarstein, L. S et Diep D. B. (1995). A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol. Microbiol.* **16**: 229-240.
222. Nés, I.F., Holo, H. (2000). Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers*, **55**: 50-61.
223. Nettles, C.G. et Barefoot, S.F. (1993). Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *J. Food Prot.*, **56**: 338-356.
224. Nielsen, J.W., Dickson, J.S et Crousse, J.D. (1990). Use of bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**:2142-2145.
225. Nieto Lozano, J.C., Nissen Mayer J., Sieten K., Pelaz C et Nes, L.F. (1992) Purification and amiamino acid sequence of a bactenocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Gen Microbiol* **138**: 985- 199.

226. Nikaido, H., Vaara, M. (1985). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.*, **49**: 1-32.
227. Nilsen, T., Nes, I.F., Holo, H. (2003). Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl Environ Microbiol*, **69**: 2975-2984.
228. Nilsson, L., Gram, L et Huss, H.H. (1999). Growth control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora. *J. Food Prot.* **62**: 336-342.
229. Nilsson, L., Huss, H.H. et Gram, L. (1997). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon by nisin and carbon dioxide atmosphere. *Int. J. Food Microbiol.* **38**: 217-227.
230. Nissen-Meyer, J., H.H. Hauge, G. Fimland V.G.H. Eijsink, et I.F. Nes. 1997. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides produced by lactic acid bacteria: their function, structure, biogenesis, and their mechanism of action. *Recent Res. Devel. Microbiol.* **1**: 141-154.
231. Nissen-Meyer, J.H., Holo, L., Håvarstein, S., Sletten, K et Nés, I.F (1992). A Novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bacterio.***174**: 5686-5692.
232. Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K. et Panyim, S. (2003). Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham, a traditional Thai fermented sausage. *International Journal of Food Microbiology*, **81**: 137-145.
233. Novel, G. (1989). Les perspectives ouvertes à l'industrie par le génigénétique des bacteries lactiques. *In-Microbiologie alimentaire:Tome.2.* (C. M. Bourgeois & J. P. Larpent , éd.). *Technique & Documentation, Lavoisier , Apria*, pp.319-334.
234. Nykânen, A., Weckman, K et Lapvetelainen, A. (2000). Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked rainbow trout by nisin and sodium lactate. *Int. J. Food Microbiol.* **61**: 63-72.
235. Ostergaard, A., Embarek, P. K. B., Wedell-Neergaard, C., Huss, H.H et Gram, L. (1998). Characterization of antilisterial lactic acid bacteria isolated from Thai fermented fish products. *Food Microbiology* **15**: 223-233.
236. O'Sullivan, L., Ross, R.P et Hill, C. (2003). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie.* **84**: 593-604.
237. Ouattara, B., Simard, R.E., Holley, R.A., Piette, J.P. et Begin, A. (1997) .Inhibitory effect of organic acids upon meat spoilage bacteria. *Journal of Food Protection* **60**: 246-253.
238. Ouwehand, A. C., Kirjavainen , P. V., Gronlund, M. M., Isolauri, S. J et Salminen, S. (1999).Adhesion of probiotic microorganisms to intestinal mucus. *International Dairy Journal*, **9**:623-630.

239. Oxford, A.E. (1944), Dipplococcin, an anti-microbial protein elaborated by certain milk streptococci. *Biochem. J.* **38**: 178- 1 82.
240. Papagianni, M., Avramidis, N., Filioussis, G., Dasiou, D. et Ambrosiadis I. (2006) Determination of bacteriocin activity with bioassays carried out on solid and liquid substrates: Assessing the factor "indicator microorganism". *Microb. Cell Fact.* **5**: 30-44.
241. Parada, J L., Caron, C. R., Bianchi, A., Medeiros, P et Soccol C. R . (2007). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as Biopreservatives . *Brazilian Archives of Biology and Technology* **50**(3) : 521-542.
242. Parente, E et Ricciardi, A. (1999). Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 628-638.
243. Parente, E. et Hill, C. (1992). Characterization of enterocin 1146, a bacteriocin from *Enterococcus faecium* inhibitory of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, **55**: 497-502.
244. Parente, E., Brienza, C, Moles, M. et Ricciardi, A. (1995). A comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity. *J. Microbiol. Meth.* **22**: 95-108
245. Parker, R. B. (1974). Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition and Health*, **29**: 4-8.
246. Parrot, M., Caufield, P. W et Lavoie, M. C. 1990. Preliminary characterization of four bacteriocins from *Streptococcus mutans*. *Can. J. Microbiol.* **36**: 123- 130.
247. Pattnaik, P., Grover, S. and Batish, V.K. (2005). Effect of environmental factors on production of lichenin, a chromosomally encoded bacteriocinlike compound produced by *Bacillus. licheniformis* 26L-10/3RA. *Microbiological Research* **160**: 213-218.
248. Penaud, S. (2006). Analyse de la séquence génomique et Etude de l'adaptation à l'acidité de *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC11842 . thèse de Doctorat de l'Institut National Agronomique de Paris-Grignon, 267p.
249. Piard, J. C, Muriana, P. M., Desmazeaud, M. J et Klaenhammer, T. R. (1992). Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 279-284.
250. Piard, J.C., Delorme, F., Giragga, G., Commissaire, J et Desmazeaud, M. (1990). Evidence for a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* CNRZ 481. *Neth. Milk Dairy J.* **44** : 143-158.
251. Plummer, S., Weaver, M. A., Harris, J. C., Dee P. et Hunter, J. (2004). *Clostridium difficile* pilot study: effects of probiotic supplementation on the incidence of *C. difficile* diarrhoea. *International Microbiology*, **7** : 59-62.
252. Pot, B., Vandamme, P et Kersters, K. (1994). Analysis of electrophoresis whole-organism protein fingerprints. In : Goodfellow et A.G O'Donnell(ed). Modern microbial methods : chemical methods in bacterial systematics. Jhon Wiley and sons Ltd, London.

253. Prescott, L. M., Harley, J. P. et Klein, D. A. (1999). Microbiology, 4th ed. New York: WCB/McGraw-Hill.
254. Pridmore R.D., Berger B., Desiere F., Vilanova D., Barretto C., Pittet A.C., Zwahlen M.C., Rouvet M., Altermann E., Barrangou R., Mollet B., Mercenier A., Klaenhammer T., Arigoni F et Schell M.A. (2004) The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101: 2512-2517.
255. Quadri, L. E., M. Kleerebezem, O. P. Kuipers, W. M. De Vos, K. L. Roy, J. C. Vederas, M et Stiles, E. (1997). Characterization of a locus from *Carnobacterium piscicola* LV17B involved in bacteriocin production and immunity: évidence for global inducer-mediated transcriptional régulation. *J. Bacteriol.* **179**: 6163-6171.
256. Rachman, C.N.,Kabadjova, R., Valcheva, R., Prevost, H et Dousset, X (2004). Identification of *Carnobacterium* specie by Restriction Length Polymorphism of the 16S-23S rDNA intergenic Spacer and Species-specific PCR. *Appl Environ Microbiol.* **70**: 4468-4477.
257. Rammelsberg, M et Radler, F. (1990). Antibacterial polypeptides of *Lactobacillus* species. *J. Appl. Bacteriol.* **69** : 177-184.
258. Ray, B. et Daeschel, M. (1992). Food biopreservatives of microbial origin. In B. Ray and M.Daeschel (éd.). CRC Press, Inc. Corporate Blvd, N.W., Boca Raton, Florida. p. 103-207
259. Ray, B. et Daeschel, M. (1994). Bacteriocins of starter culture bacteria. In M. Dillon & G. Board (Eds.), *Natural antibacterial Systems and food préservation* (pp. 133). Oxon UK: CAB International. Reed G), VCH, Weinheim. bacteria. *Bacteriological Reviews*, **40**(3): 722-756.
260. Rementzis, J et Samelis, J. (1996). Rapid GC analysis of cellular fatty acids for characterizing *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* strains of meat origin. *Lett. Appl. Microbiol.* **23**: 379-384.
261. Richard, C, Leroi, F., Brillet, A., Rachman, C, Connil, N., Drider, D., Pilet, M.F., Onno, B., Dousset, X. et Prévost, H. (2004). Maîtrise du développement de *Listeria monocytogenes* dans le saumon fumé: intérêt de la biopréservation par des bactéries lactiques. *Lait.* **84**: 135-144.
262. Rilla, N., Martinez, B., Delgado, T. et Rodriguez, A. (2003) Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in Vidiago cheese by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IPLA 729, a nisin Z producer. *Int. J. Food Microbiol.* **85**: 23- 33
263. Ringe, E. et Gatesoupc, F.J. (1998). Lactic acid bacteria in fish: A review. *Aquaculture.* **160**: 177-203.
264. Rodgers, S. (2001). Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures.. *Trends Food Sci. Technol.* **12**: 276-284.

- 265.** Rodriguez, J.M., Martinez, M.I. et Kok, J. (2002). Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Crit. Rev. Food Sci. Nul*, **42**: 91-121.
- 266.** Rosenfeldt, V., Benfeldt, E., Valerius, N. H., Paerregaard, A et Michaelsen, K. F. (2004). Effect of probiotics on gastrointestinal symptoms and small intestinal permeability in children with atopic dermatitis. *Journal of Pediatrics*, **145**: 612-616.
- 267.** Rosenfeldt, V., Michaelsen, K. F., Jakobsen, M., Larsen, C.N., Moller, P. L., Pedersen, P., Tvede, M., Weyrehter H., Valerius N. H et Paerregaard A. (2002). Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in young children hospitalized with acute diarrhea. *Pediatrics and Infectious Diseases Journal*, **21**: 411-416.
- 268.** 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.
- 269.** Ross, R.P., Morgan, S et Hill, C. (2002) Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology* **79**: 3-16.
- 270.** Ruhland, G.J. et Fiedler, F. (1987). Occurrence and biochemistry of lipoteichoic acids in the genus *Listeria*. *System. Appl. Microbiol.* **9**: 40-46.
- 271.** Ryan, M.P., Flynn, J., Hill, C, Ross, R.P. et Meaney, W.J. (1999). The natural food grade inhibitor, lacticin 3147, reduced the incidence of mastitis after experimental challenge with *Streptococcus dysgalactiae* in nonlactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **82**: 2625-2631.
- 272.** Sahl, H.G et Bierbaum, G (1998). Lantibiotics biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol*, **52**: 41-60.
- 273.** Schillinger, U., Geisen, R. and Holzapfel, E.H. (1989). Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends Food Sci. Technol*, **1**: 158-164.
- 274.** Schillinger, U., Lucke, F.K. (1989). Identification of Lactobacilli from meat products. *Food Microbio.* **4**: 199-208.
- 275.** Schleifer, K. H. et Kilpper-Balz, R. (1987). Molecular and chromotaxonomic approaches to the classification of *Sreptococci*, *Enterococci* and *Lactococci*. *Rev. Sys. Appl. Microbiol.*, **10**: 1-19.
- 276.** Schleifer, K. H. et Ludwig, W. (1995). Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *System Appl Microbiol* **18**: 461-467.
- 277.** Schleifer, K. H et Stachebrandt, E. (1983). Molecular systematics of prokaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.* **37**:143-187.
- 278.** Schved, F., Henis, Y., Juven, B.J. (1994a). Response of spheroplasts and chelator-permeabilized cells of Gram-negative bacteria to the action of the bacteriocins pediocin SJ-1 and nisin. *Int. J. Food Microbiol.*, **21**: 305-314.

279. Schved, F., Lindner, P et Juven, B.J. (1994b). Interaction of bacteriocin pediocin SJ-1 with the cytoplasmic membrane of sensitive bacterial cells as detected by ANS fluorescence. *J. Appl. Bacteriol.*, **76**: 30-35.
280. Scott, V.N. et Taylor, S.L. (1981). Effect of nisin on the outgrowth of *Clostridium botulinum* spores. *J. Food Sci.* **46**:117-20
281. Sejong, Oh., Sae-Hun, K., Yong, Ko., Jae-Hun, Sim., Kwang Soo, Kim., Seung-Hwa, Lee., Sungsu, P. et Young, J.K. (2006). Effect of bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. HY 449 on skin-inflammatory bacteria. *Food Chem. Toxicol.* **44**: 552-559.
282. Shahani KM. Vakil JR, Kilara A (1976) Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *L. bulgaricus*. II. Isolation of acidophilin from *L. acidophilus*. *Cultured Dairy. Prod J* **12** :8-11.
283. Shewmarker, P.L., Steigerwalt, A.G., Morey, R.E., Carvalho, MdGS., Elliott, A.J., Joyce, K., Barrett, T.J., Teixeira, L.M et Facklam, R.R. (2004). *Vagococcus carniphilus* sp. Nov., isolated from ground beef. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 1505-1510.
284. Simmonds, R.S., Simpson, W.J et Tagg, J.R. (1997). Cloning and sequence analysis of zooA, a *Streptococcus zooepidermicus* gene encoding a bacteriocin-like inhibitory substance having a domain structure similar to that of lysostaphin. *Gen*, **189**: 255-261.
285. Simpson, W.J et Taguchi, H. (1995). The genus *Pediococcus* with notes on the genera Tetragenococcus and Aerococcus. In the Genera of lactic acid bacteria; Wood BJB., Holzabef HW, Eds; Chapman & Hall, London,125-172.
286. Smith, L., Zachariah, C., Thirumoorthy, R., Rocca, J., Novak J., Hillman, J. D et Edison, A.S. (2003). Structure and dynamics of the lantibiotic mutacin 1140. *Biochem.* **42**: 10372-10384.
287. Sperber, W.H. et Swan, J. (1976). Hot-loop test for the determination of carbon dioxide production from glucose by lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**: 990-991.
288. Stackebrandt, E., Goebel, B.M. (1994). Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present specie definition in bacteriology. *Int. J. Sys. Bacteriol.* **44**: 846-849.
289. Stackebrandt, E. et Teuber, M. (1988). Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie*, **70**: 317-324.
290. Stanton, C., Gardiner, G., Meehan, H., Collins, K., Fitzgerald, G., Lynch, P. B. et Ross, R. P. (2001). Market potential for probiotics. *American Journal of Clinical Nutrition*, **73**: 476-483.
291. Steen, M.T., Chung, Y.J. et Hansen, J.N. (1991). Characterization of the nisin gene as part of a polycistronic operon in the chromosome of *Lactococcus lactis* ATCC11434. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1181-1188.

- 292.** Stern, N.J., Svetoch, E.A., Eruslanov, B.V., Perelygin, V.V., Mitsevich, E.V., Mitsevich, I.P., Pokhilenko, V.D., Levchuk, V.P., Svetoch, O.E. et Seal, B.S. (2006). Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal System. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:3111-3116
- 293.** Stevens, LA., Sheldon, B.W., Klapes, N.A et Klaenhammer, T.R. (1991), Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram- negative bacteria. *Appl. Environ.Microbiol.*, **57**(12): 3613-3615.
- 294.** Stiles, M.E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuw.* **70**: 331-340.
- 295.** Stiles, M.E. et Holzapfel, E.H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current applications and effects. *Meat Sci.* **65**: 935-948.
- 296.** Suarez, A. M., Azcona, J. I., Rodriguez, J. M., Sanz, B. et Hernandez, P. E. (1997). One-step purification of nisin A by immunoaffinity chromatography. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4990-4992.
- 297.** Sudirman, I., Mathieu, F., Michel, M. et Lefebvre, G. (1993). Detection and properties of curvaticin 13, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus curvatus* SB13. *Curr. Microbiol.* **27** : 35-40.
- 298.** Tagg, J. R., Jack, R. W., Heng, N. C. et Haie, J. D. (2005). Identification of *nImTE*, the locus encoding the ABC transport System required for export of non-lantibiotic mutacins in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **187**: 5036-5039.
- 299.** Tagg, J.R, Dajana, A.S. et Wannamaker, L.W. (1976), Bacteriocins of Gram-positive *Bacteriol. Rev.*, **40**: 722-756.
- 300.** Tagg, J.R. et McGiven, A.R. (1971). Assay system for bacteriocins. *Appl. Microbiol.*, **21**, 943-948.
- 301.** Tahiri, I. (2007). Isolement, caractérisation et étude de la divergicine M35, pour la bio-concervation des produits marins prêts à consommer, Thèse doctorat en sciences et technologie des aliments, la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
- 302.** Tahiri, L, Desbiens, M., Benech, R., Kheadr, E., Lacroix, C, Thibault, S., Ouellet, D. and Takeuchi, O., Hoshino, K et Akira, S. (2000). Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *Journal of Immunology*, **165**: 5392-5396.
- 303.** Taylor, J.I., Hirsch, A. et Mattick, A.T.R. (1949). The treatment of bovine streptococcal and staphylococcal mastitis with nisin. *Vet. Rec.* **61**: 197-198.
- 304.** Terzaghi, B et Sandine, W. F. (1975) . Improved medium for lactic Streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.*, **29**:807-813.

- 305.** Teuber, M. (1993) Biological Fundamentals. Biotechnology vol.1, p325. (Editeurs: Rhem HJ,
- 306.** Teuber, M. (1992). Lactic acid bacteria. *Eds. Anonyme ,Munich, Swidserland.* pp. 325-344.
- 307.** Tichaczek, P.S., Nissen-meyer, J., Nes, I.F., Vogel, R.F et Hammes, W.P. (1992).Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin p. from *L. sake* LTH673. *System. Appl. Microbiol.*, **15** : 460-468.
- 308.** Toba T., Samant, S.K., Yoshioka, E et Itoh, T. (1991). Reuterin 6, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus reuteri* LA 6. *Lett. Appl. Microbiol*, **13** : 281-286.
- 309.** Turcotte, C, Lacroix, C, Kheadra, E., Grignon, L. et Fliss, I. (2004) A rapid turbidometric microplate bioassay for accurate quantification of lactic acid bacteria bacteriocins. *Int. J. Food Microbiol.* **90**: 283- 293
- 310.** Twomey, D.P., Ross, R.P., Ryan, M., Meaney, B et Hill, C. (2002). Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie Van Leewenhoek.* **82**: 165-185.
- 311.** Uhlman, L., Schillinger, U., Rupnow, J.R., et Holzapfel, W.H. (1992). Identification and characterization of two bacteriocin-producing strains of *Lactococcus lactis* isolated from vegetables. *International Journal of Food Microbiology* **16**: 141-151.
- 312.** Upreti, G.C et Hindsill, R.D. (1973). Isolation and characterization of a bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **4**: 487-494.
- 313.** Van belkum, M.J., Kok, J., Venema, G., Holo, H., Nes, I.F., Konings, W.M et Abee, T. (1991). The bacteriocin lactococcin A specifically increases permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independant, protein-mediated manner. *J. Bacteriol.* **173** : 7934-7941.
- 314.** Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos P., Kersters, K et Swings, J. (1996). Polyphasic taxonom, a concensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60**: 407-438.
- 315.** Van't Hul, J. S et Gibbons W. R. (1996). Concentration and recovery of the bacteriocin nisin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Biotechnol Appl. Biochem.* **24**:251-256.
- 316.** Vauterin, L et Vauterin, P. (1992). Computer-aided objective comparis on of electrophoresis patterns for grouping and indentionation of microorganisms. *Europ. Microbiol.* **1**:37-41.
- 317.** Vaz-Velho, M., Todorov, S., Ribeiro, J et Gibbs, P. (2005). Growth control of *Listeria innocua* 2030c during processing and storage of cold-smoked salmon-trout by *Carnobacterium divergens* V41 culture and supernatant. *Food Control.* **16**: 541-549.

- 318.** Vela, A.I., Garcia, N., Latre, M.V., Casamayor, A., Sanchez-porro, C., Briones, V., Ventosa, A., Dominguez, L et Fernandez –garayzabal, J.F. (2007). *Aerococcus suis* sp. nov., isolated from clinical specimens from swine. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **57**: 1291-1294.
- 319.** Venema, K, Venema, G et Kok, J. (1995). Lactococcal bacteriocins: mode of action and immunity. *Trends Microbiol* ,**3**: 299-304
- 320.** Venema, K., Abee, T., Haandrikman, A.J., Leenhouts, K.J., Kok, J., Konings, W.N et Venema, G. (1993). Mode of action of lactococcin B, a thiol-activated bacteriocin from *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol*, **59**: 1041-1048.
- 321.** Venema, K., Dost, M.H.R., Beun, P.A.H., Haandrikman, A.J., Venema, G et Kok, J. (1996). The genes for secretion and maturation of lactococcins are located on the chromosome of *Lactococcus lactis* IL1403. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1689-1692.
- 322.** Verdu, E. F., Bercik, P., Bergonzelli, G. E., Huang, X. X., Blennerhasset, P., Rochat, F., Fiaux, M., Mansourian, R., Cortesy-Theulaz, I et Collins, S. M. (2004). *Lactobacillus paracasei* normalizes muscle hypercontractility in a murine model of postinfective gut dysfunction. *Gastroenterology*, **127**: 826-837.
- 323.** Vescovo, M., Scolari, G et Zacconi, C. (2006). Inhibition of *Listeria innocua* growth by antimicrobial-producing lactic acid cultures in vacuum-packed cold-smoked salmon. *Food Microbiol.* **23**: 689-693.
- 324.** Vlaemynck, G., Herman, L et Coudijzer, K. (1994). Isolation and characterization of two bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* strains inhibitory to *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology.* **24**: 211-225.
- 325.** Vos W.M., Siezen R.J. (2003) Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** :1990-1995.
- 326.** Wachsman, M., Kulka, M., Smith, C.C et Aurelian, L. (2003). A growth and latency compromised herpes simplex virus type 2 mutant (ICPIODeltaPK) has prophylactic and therapeutic protective activity in guinea pigs. *Vaccine.* **28**:1879-1890.
- 327.** Walter J., Hertel, C., Tannock, GW., Lis, C.M., Munro, K et Hammes, W.P (2001). Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67** : 2578-2585.
- 328.** Wang, P. H., Hsu, C. I., Tang, S. C., Huang Y. L., Lin, J. Y et Ko, J. L. (2004). Fungal immunomodulatory protein from *Flammulina velutipes* induces interferon-gamma production through p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 2721-2725.
- 329.** Wessels, S et Huss, H.H. (1996). Suitability of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* ATCC 11454 as a protective culture for lightly preserved fish products. *Food Microbiol.* **13**: 323-332.

- 330.** West, C.A et Warner, P.J. (1988). Plantacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NCDO 1193. *FEMS Microbiol. Lett.* **49** : 163-165.
- 331.** Whitehead, H.R. (1933), A substance inhibiting bacterial growth, produced by certain strains of lactic streptococci. *Biochem. J.* **27(2)**: 1793- 1800.
- 332.** Wiedemann, L., Breukink, E., Van Kraaij, C., Kuipers, O. P., Bierbaum, G., de Kruijff, B et Sahl, H. G. (2001). Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J. Biol. Chem.* **276**: 1772-1779.
- 333.** Worobo, R.W., Van Belkum, M.J., Sailer, M., Roy, K.L., Vederas, J.C., Stiles et M.E. (1995). A signal peptide secretion –dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *J. Bacteriol*, **177**: 3143- 3149.
- 334.** Yang, R., Johnson., M. C et Ray, B. (1992). Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3355-3359.
- 335.** Zakrzewska-Czerwinska, J., Mordarski, M. et goodfellow. M. (1988). DNA bas composition and homology value in the classification of some *Rhodococcus* species. *J. Gen. Microbiol.* **134**:3807-3813.

Tableau 01 : Caractéristiques différentielles des bactéries lactiques (Dérivée à partir de Axelsson, 1998 ; Leisner *et al.*, 2000)

Caractéristiques	<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus Vagococcus</i>	<i>Leuconostoc Oenococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Tetragenococcus</i>	<i>Weisella</i>
Morphologie	bacilles	bacilles	coques	coques	coques	Coques ovales	coques	coques	coques	Coques/ bacilles
Formation des tétrades	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
Gaz à partir de glucose	-	±	-	-	-	+	-	-	-	+
Croissance à 10°C	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
Croissance à 45°C	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-
Croissance 6.5% NaCl	ND	±	+	+	-	±	±	-	+	±
Croissance 18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Croissance à pH 4.4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	±
Croissance à pH 9.6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
Isomère d'acide lactique	L	D, L, DL	L	L	L	D	L, DL	L	L	D, DL
Hydrolyse d'arginine	+	±	ND	±	-	-	±	±	ND	-
mDAP	+	±	ND	-	-	-	-	-	ND	-

+ positive ; - négative ; ± résultats variés selon l'espèces ; ND, non déterminé.

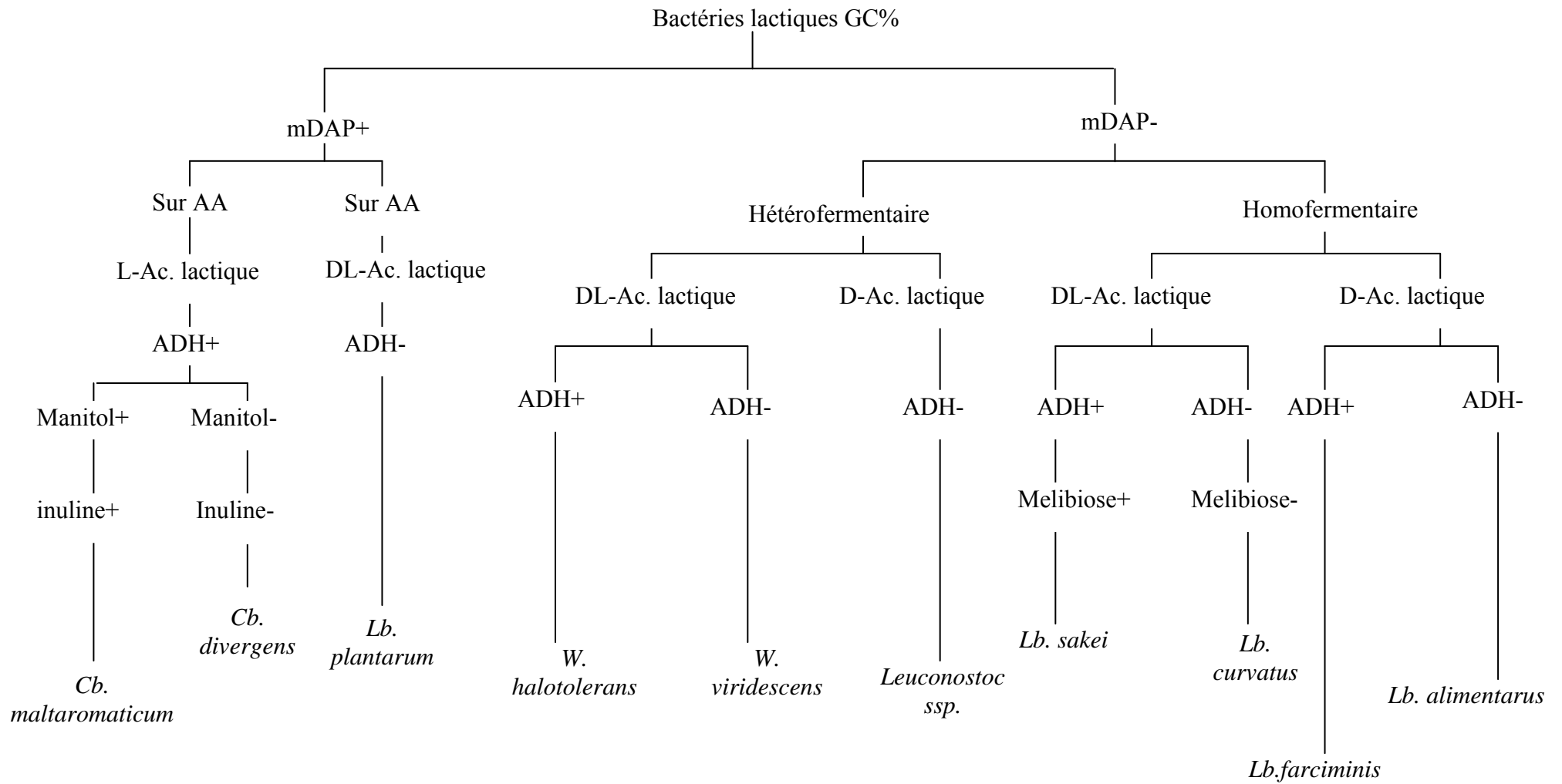


Figure 02: Clef d'identification des bactéries lactiques (Montel *et al.*, 1991).

Tableau 05: Les bactériocines produites par différentes espèces de bactéries lactiques (Parada *et al.*, 2007).

Souche productrice	Bactériocine	Spectre d'activité	Caractéristiques
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Nisine	Bactéries Gram-positives	Lantibiotique. Classe I, PM = 3,5 kDa, 34 acides aminés, existe sous forme commercialisée
	Lacticine 3147	<i>Clostridium</i> ssp, <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus dysgalactiae</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Propionibacterium acne</i> , <i>Streptococcus mutans</i>	Lantibiotique, classe I, PM = 4,2 kDa, thermostable, active à pH acide et à pH physiologique
<i>Lactococcus. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Lactococcine B	<i>Lactobacillus</i>	Bactériocine de la classe II, PM approx. 5 kDa, spectre d'activité restreint
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Acidocine CH5	Bactéries Gram-positives , <i>Lactobacillus</i>	Bactériocine de la classe III, forme des agrégats de haut PM
	Lactacine F	<i>Lactobacillus. fermentum</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Lactobacillus. delbrueckii</i> <i>Lactobacillus. helveticus</i>	Bactériocine de la classe II, PM = 6,3 kDa, 57 acides aminés, thermostable à 121° C pdt 15 minutes
	Lactacine B	<i>Lactobacillus. deprweckii</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus.bulgaricus</i> . <i>Lactococcus. lactis</i> .	Bactériocine de la classe II, PM =6,3 kDa, thermostable, détectée uniquement lorsque la culture bactérienne, son activité est maintenue entre pH 5.0 et 6.0
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	Lactobine A	<i>Lactobacillus. acidophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Bactériocine de la classe II, PM =4,8 kDa, 50 acides aminés, spectre d'activité restreint
<i>Lactobacillus casei</i>	Lactocine 705	<i>Listeria. monocytogenes</i> <i>Lactobacillus. plantarum</i>	Bactériocine de la classe II (deux chaînes α et β (33 acides amines / chaîne), PM= 3,4 kDa.
<i>Leuconostoc gelidum</i>	Leucocine A	<i>Lactobacillus</i>	Bactériocine de la classe II, PM=3,9 kDa, 37

		<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Listeria monocytogenes</i>	acides aminés, stable à pH bas et après chauffage (100°C pdt 20 min)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Mesentericine Y105	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Listeria monocytogenes</i>	Bactériocine de la classe II, PM=3,8 kDa, 37 acides aminés, thermostable (60°C pdt 120 min à pH 4.5)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Pediocine F	Bactéries Gram-positives	Bactériocine de la classe II, PM=4,5 kDa, sensible aux enzymes protéolytiques, résistante à la chaleur et aux solvants organiques, active dans une large gamme de pH
	Pediocine PA-1	<i>Listeria monocytogenes</i>	bactériocine de la classe II, PM=4,6 kDa, 44 acides aminés
	Pediocine AcH	Bactéries Gram positives /négatives	Bactériocine de la classe II, PM=4,6 kDa, 44 acides aminés, spectre d'activité étendu
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Pediocine A	<i>Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Staphylococcus, Enterococcus, Listeria, Clostridium</i>	Bactériocine de la classe II, PM= 2,7 kDa, sensible aux enzymes protéolytiques stable à la chaleur (10 min 100°C)
<i>Enterococcus faecium</i>	Enterocine A	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Pediococcus</i>	Bactériocine de la classe II, PM= 4,8 kDa, 47 acides aminés, thermostable
<i>Lactobacillus sakei</i>	Lactocine S	<i>Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus</i>	Bactériocine de la classe I, PM= 3,7 kDa, active entre pH 4,5 et 7,5
	Sakacine P	<i>Listeria monocytogenes</i>	Bactériocine de la classe II, PM= 4,4 kDa, thermostable
<i>Lactobacillus curvatus</i>	Curvacin A	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	bactériocine de la classe II, PM=, 4,3 kDa
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Helveticine J	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactococcus lactis</i>	Bactériocine de la classe III, PM= 37 kDa, spectre d'activité restreint, sensibles aux enzymes protéolytiques, réduction de son activité après chauffage à 100° C pdt 30 min

Tableau 17 : Identification des souches appartenant aux genres *Lactococcus*, *Enterococcus* et à l'espèce *Streptococcus thermophilus*

Espèce	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>			<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>			<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>			<i>S. thermophilus</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>
	5	4	2	15	4	4	4	1	1	9	2	15
Tests préliminaires												
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
La catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
La mobilité	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
La nitrate réductase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
La cytochrome oxydase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tests physiologiques												
La croissance à 10°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
La croissance à 30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
La croissance à 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
La croissance à 40°C	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
La croissance à 45°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
La thermorésistance à 60°C pdt 30mn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
La thermorésistance à 65°C pdt 30mn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
La croissance sur lait de SHERMAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Réduction de lait tournesolé	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
La citratase	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
La production de CO ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
La production d'acétoïne	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
L'hydrolyse de la gélatine	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
L'ADH	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
La croissance à 2 % de NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
La croissance à 4 % de NaCl	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+
La croissance à 6.5 % de NaCl	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+
Fermentation des sucres												
Arabinose	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Cellobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Dextrine	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+
Maltose	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Tréhalose	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+
Xylose	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Glucose	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+
Saccharose	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+
Hydrolyse de l'esculine	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+

+ : résultat positif, - : résultat négatif, +* : résultat positif mais faible

Tableau 16 : Identification des souches appartenant au genre *Lactobacillus*.

Nombre des souches/espèce	15	2	10	4	2	5	2	4	1	5	6	8	2
Tests préliminaires													
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
La catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
La nitrate réductase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
La cytochrome oxydase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
La mobilité	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tests physiologiques													
La croissance à 15 °C	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-
La croissance à 45 °C	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
La production de CO2	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
L'ADH	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
L'halotolérance à 2 % NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L'halotolérance à 4 % NaCl	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+/-	+/-	+	+
L'halotolérance à 6.5 % NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Hydrolyse de l'esculine	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-
Fermentation des sucres													
Arabinose	+	+	-	-	+	+	(-)	(+)	(-)	-	+	-	-
Cellobiose	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
Galactose	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	-	+	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+	+

+* : résultat positif mais faible

(+) (-) : résultats obtenus pour les sucres qui ne sont pas figurés parmi les caractères à tester pour l'espèce.

Maltose	+	-	+	+*	+	-	+	-	+	+	+	+	+/-
Mannitol	+	+*	+*	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
Mellibiose	+*	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-
Raffinose	+	+	-	-	+	-	(+)	(-)	(+)	-	+	+	-
Rhamnose	+*	+*	+	+	(-)	(-)	(+)	(-)	-	-	+	-	-
Ribose	+	+	+	+	+	-	(-)	+	(-)	+	+	-	-
Xylose	+	+	-	-	-	+	-	(-)	(-)	-	+/-	-	-
Tréhalose	+	+	+	+	+	-	-	(+)	(+)	-	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+*	(-)	(+)	+	-	+	-	+	-	-
Mélicitose	+	+*	+*	+	-	+	+	(+)	+	-	-	+	-
Sorbitole	+	+	+	+	+	(-)	-	-	+	-	+	+	-
Saliciline	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
Mannose	-	-	-	(+)	+	-	(+)	(-)	(-)	+	+	+	+
Glucose	+	+	-	(+)	+	+	+	+	+*	+	+	+	+
Espèce présumée	<i>Lb plantarum</i>		<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i>	<i>Lb . rhamnosus</i>	<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. kandleri</i>	<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. delbruekii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>Lb. delbruekii</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb. pentosus</i>	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	<i>Lb. helveticus</i>

+ : résultat positif, - : résultat négatif, +* : résultat positif mais faible

(+) (-) : résultats obtenus pour les sucres qui ne sont pas figurés parmi les caractères à tester pour l'espèce.

Tableau 24 : Spectres d'activité des substances antibactériennes produites par les différentes bactéries isolées.

Bactérie indicatrice	Milieux ^a utilisés	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)				
		<i>Lb. plantarum</i> JB44	<i>Lb. brevis</i> LB93	<i>Lb. curvatus</i> LB65	<i>Lc.lactis subsp.lactis</i> JB31	<i>Lc.lactis subsp.lactis</i> RB22
<i>Lactobacillus brevis</i> LB05	MRS	11	00	00	06	00
<i>Lactobacillus casei</i> LB14	MRS	08	05	15	11	04
<i>Lactobacillus plantarum</i> LB2	MRS	05	06	13	09	04
<i>Lactobacillus lactis</i> LB14	MRS	06	04.5	00	10	05
<i>Lactobacillus ramnosus</i> JB02	MRS	09	05	14	09	07
<i>Lactobacillus helveticus</i> JB08	MRS	04	08	06	08	05
<i>Lactobacillus lactis</i> RB01	MRS	11	10.5	06	04	01
<i>Lactobacillus casei</i> RB06	MRS	13	10.5	07	13	06
<i>Lactobacillus lactis</i> RB11	MRS	10	12	11	10	05
<i>Staphylococcus aureus</i> EJ02	BHI	11	06	13	11	09
<i>Micrococcus luteus</i> 247	BHI	12	10	04	10	01
<i>Aeromonas hydrophilus</i> 686	GN	00	05	04	08	10
<i>Escherichia. coli. ssp</i> CH03	GN	00	00	00	00	00
<i>Salmonella spp.</i> CH04	SS	00	00	00	00	07
<i>Enterococcus faecalis</i> IP02	BHI	03	07	01	11	01
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	BHI	09	12	12	11	01
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14578	GN	06	07.5	07	13	00
<i>Bacillus stearothermophilus</i> 43	GN	09	07	08	12	01
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC8	GN	06	05.5	08.5	12	00
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25293	BHI	12	06	15	08	14.5
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	TSA	13	17	12.5	14	16
<i>Pseudomonas fluorescens</i> IP01	MAC	12	00	00	10	00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	MAC	13.5	00	00	09	06
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25422	GN	00	00	00	00	04
<i>Lb. plantarum</i> JB44	MRS	00	02	14	08	08
<i>Lb. curvatus</i> LB65	MRS	09	02	00	05	04
<i>Lb. brevis</i> LB93	MRS	11	00	09	05	11
<i>Lc.lactis subsp.lactis</i> JB31	M17	10	14.5	04.5	00	03
<i>Lc.lactis subsp.lactis</i> RB22	M17	11.5	12	07	03	00

a : voir composition des milieux de culture dans l'annexe

Tableau 26 : Rendement des étapes de purification de la curvaticine MB65. La fraction FI correspond au surnageant centrifugé et concentré, la fraction FII à la fraction FI précipitée par le sulfate d'ammonium et dialysée ; la fraction FIII à la partie de la fraction FII qui s'est désorbée d'une colonne QAE sephadex A-25 avec 0.5 M de NaCl, et la fraction FIV à un pic actif résultant d'une injection de la fraction FIII sur une colonne échangeuse anionique DEAE.

échantillon	Volume (ml)	Unité arbitraire (UA/ml)	Activité totale (UA)	Concentration de la protéine (mg/ml)	Protéine totale (mg)	Activité spécifique (AU/mg)	Rendement de purification (%)	Facteur de purification
Surnageant de l'extrait cellulaire	500	256	128000	15,62	7810	16,39	100	100
Précipitation par les sulfates d'ammonium à 80% dialyse et liophilisée	100	512	51200	7,20	720	71,11	40	4
QAE sephadex A-25 QAE	10	1024	10240	1,80	18	568,88	08	35
HPLC sur échangeur anionique DEAE	0,5	1024	512	0,24	0,12	4266,66	0,4	260

L'activité spécifique (AU/mg) = l'activité totale de la subséquente étape de purification/protéine totale de la même étape.

Rendement de purification (%) = l'activité totale de la subséquente étape de purification/ l'activité totale du surnageant.

Facteur de purification = Activité spécifique de la subséquente étape de purification/ Activité spécifique du surnageant.

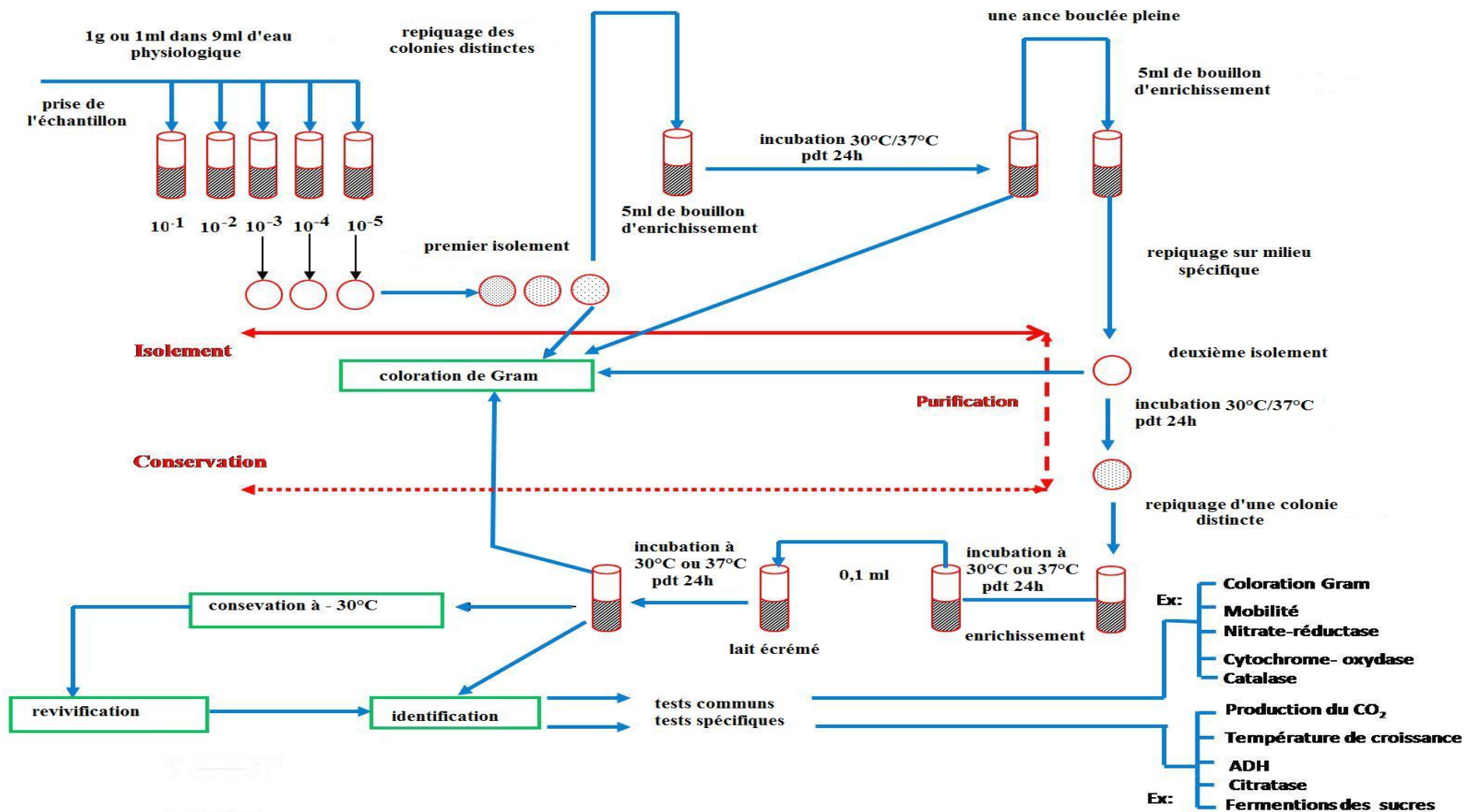


Figure 06 : Protocole d'isolement, de purification et d'identification des souches lactiques

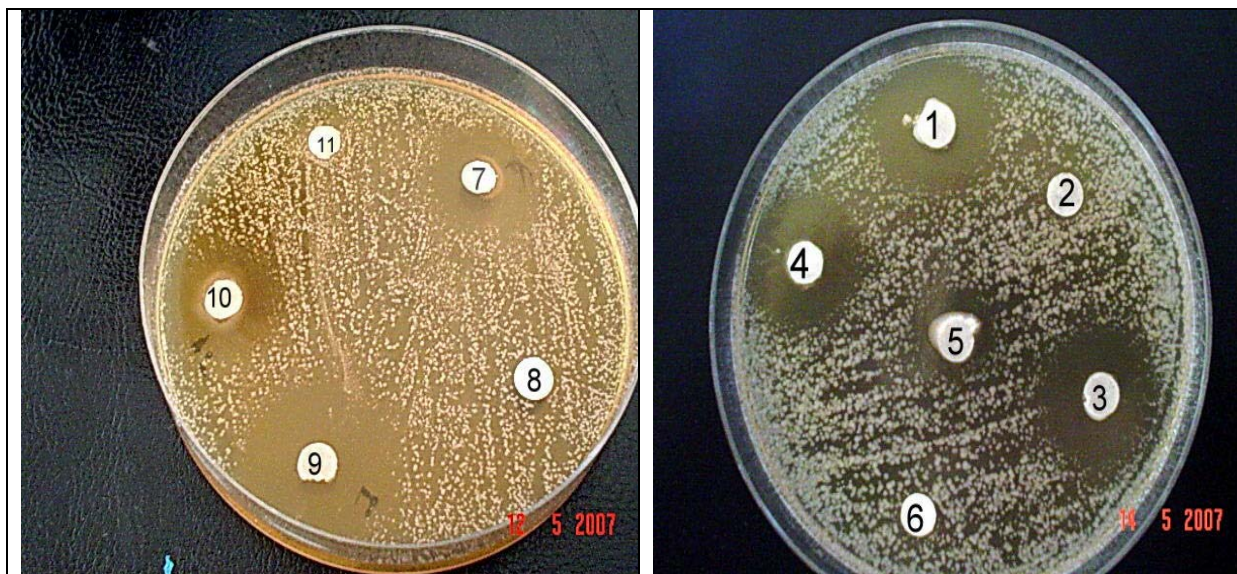


Figure 09a : Révélation de l'activité antimicrobienne des souches sélectionnées par la méthode de diffusion en gélose .

1 : *Lb. plantarum* JB44, **3:** *Lb. brevis* LB93, **09 :** *Lb. curvatus* LB65, **10 :** *Lc. lactis* subsp. *lactis* JB31et **4:** *Lc. lactis* subsp. *lactis* RB22

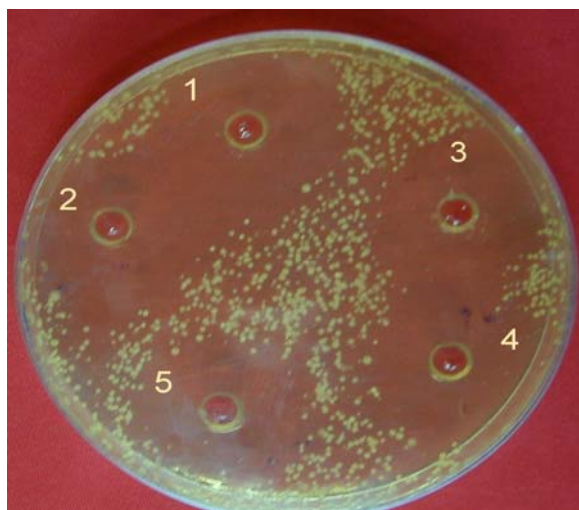


Figure 09b : Révélation de l'inhibition (méthode de diffusion en puits) de *L. monocytogenes* ATCC7644 par les extraits actifs des souches bactériocinogènes.

1 : *Lb. plantarum* JB44, **2 :** *Lb. brevis* LB93, **3 :** *Lb. curvatus* LB65, **4 :** *Lc. lactis* subsp. *lactis* JB31et **5 :** *Lc. lactis* subsp. *lactis* RB22